



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire N série:.....
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمّـة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques

Spécialité: Biochimie Appliquée

THEME

Contribution à la caractérisation d'une α -amylase produite par
une souche levurienne isolée à partir d'un milieu extrême

Présenté Par:

M^{elle} BESSEI Ouassila

M^{elle} REMHA Ilham

Devant le jury composé de:

Présidente:	M ^{me} . TOUMI Ikram	M.A.A, Université d'El-Oued.
Examinatrice:	M ^{elle} . BOUKHARI Dalal	M.A.B, Université d'El-Oued.
Promoteur:	M. LAICHE Ammar Touhami	M.A.A, Université d'El-Oued.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dédicace



Le présent travail, fruit de longues
années d'efforts et de persévérance
est dédié A toutes personnes qui nous
sont chères surtout à nous parents
qui nous ont beaucoup donné
pour être ce que nous sommes



Isham & Ouassifa



REMERCIEMENTS

Avant tous, nous remercions *ALLAH* tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage, la patience et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à notre encadreur *M. LAICHE AMMAR TOUHAMI* pour ses conseils judicieux et son appui tout au long de cette étude et surtout pour ses nombreuses critiques constructives. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail, *M^{me}. TOUMI Ikram* qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, et *M^{lle}. BOUKHARI Dalal* qui nous a honorés de bien vouloir examiner ce travail.

Nos vifs remerciements vont à *M. TLIBA ALI*, responsable de laboratoire VTRS au niveau d'université EL-Chahid Hamma Lakhdar El-Oued, à *M^{me}. ZOUBIRI FATIA*, directrice de laboratoire FATI LAB, pour son aide précieuse et de nous avoir accueillie au sein de son laboratoires où une partie de notre travail a été fait.

Un grand merci aux techniciens des laboratoires de l'institut I.N.R.A.A. et l'équipe des laboratoires de la faculté de Sciences de la nature et de la vie, en particulier *M^{me}. BOUCHRA* pour sa patience, ses conseils et sa grande disponibilité.

Nous n'oublions pas de remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué à nos formations, et tous nos collègues de promotion 2017, Master II Biochimie Appliquée.

Finalement, nous remercions nos amies, nos familles qui nous ont soutenus avec patience et qui nous ont donné leur confiance, merci pour leur encouragement et leur compréhension. Nous leur exprimons notre éternelle gratitude.

A tous ceux qui nous ont aidés à accomplir cette tâche, soit directement ou indirectement, nous disons :

MERCI



Résumé

Cette étude vise à produire et caractériser une enzyme amylolytique (α -amylase) sécrétée par des levures isolées à partir du sol saharien algérien (Sidi Mastour El-Oued).

Cinq souches levuriennes ont été isolées à partir d'échantillon de sol saharien d'El-Oued. Ces dernières, sont sélectionnées sur un milieu PDA à 4 % d'amidon. Les résultats ont montré que 3 souches seulement ont donné des zones d'hydrolyse.

L'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques révèle que ces trois souches appartiennent à l'espèce: *Candida glabrata* (S2), *Rhodotorula mucilaginosa* (S3) et *Candida lusitaniae* (S5).

Par sa richesse en sucre totaux (25.17 %), le sirop de datte est considéré comme milieu favorable à la survie des levures amylolytiques. L'étude cinétique de la production de l' α -amylase est réalisée en batch dans des flacons en verre de 200 ml contenant 50 ml de milieu de base (température de 30 °C et pH 5).

Dans ces conditions, on a obtenu une biomasse de 33.75 g/L et une activité amylasique de 2300 μ g/ml/j après 4 jours de fermentation de *C. glabrata*. Par ailleurs, les profils cinétiques de croissance et de production enzymatique ont montré que la synthèse amylasique est de type associée à la croissance de la levure.

L'étude comparative des 3 isolats pour la production des α -amylases a sélectionné *C. glabrata*, pour leur activité amylolytique élevée par rapport aux autres.

La purification partielle de l' α -amylase de *C. glabrata* par le sulfate d'ammonium (60 %), a donné une activité spécifique d'enzyme de 78.88 U/mg avec une degré de purification de 2.73 fois. L' α -amylase partiellement purifié, a un pH optimum de 6 et une température optimale de 55 °C.

L'étude cinétique de l' α -amylase de *C. glabrata* partiellement purifiée a donné une $V_{\max}$ de (1016.26 μ g/ml) et un K_m de (0,27 mg/ml).

Mots clés: α -amylase, *Candida glabrata*, Levure, Purification, Sirop de datte.

Abstract

This study aims to produce and characterize an amylolytic enzyme (α -amylase) secreted by yeasts isolated from algerian saharan soil (Sidi Mastour El-Oued).

Five yeast strains were isolated from a sample of El-Oued saharan soil. The latter are selected on a 4 % of starch PDA medium. The results showed that only 3 strains gave zones of hydrolysis.

The study of the morphological, physiological and biochemical characteristics reveals that these three strains belong to the species: *Candida glabrata* for S2, *Rhodotorula mucilaginosa* for S3 and *Candida lusitaniae* for S5.

By its richness in total sugar (25.17%), date syrup is considered as a medium favorable to the survival of amylolytic yeasts. The kinetic study of the production of α -amylase is carried out in batch in 200 ml vials containing 50 ml of base medium (temperature is 30 ° C and pH 5).

Under these conditions, a biomass of 33.75 g/L and an amylase activity of 2300 μ g/ml/day were obtained after 4 days of fermentation of *C. glabrata*. Moreover, the kinetic profiles of growth and of enzymatic production have shown that the amylase synthesis is of a type associated with the growth of the yeast.

The comparative study of the 3 isolates for the production of α -amylases selected *C. glabrata* for their high amylolytic activity compared to the others.

Partial purification of *C. glabrata* α -amylase by ammonium sulfate (60%) gave an enzyme specific activity of 78.88 U / mg with a purification degree of 2.73 folds. The partially purified α -amylase has an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 55 ° C.

The kinetic study of partially purified *C. glabrata* α -amylase gave a $V_{\max}$ value (1016.26 μ g/ml) and a K_m value (0.27 mg/ml).

Key words: α -amylase, *Candida glabrata*, Date syrup, Purification, Yeast.

تهدف هذه الدراسة الى إنتاج و دراسة خصائص إنزيم محلل للنشاء (ألفا اميلاز) منتج من طرف خميرة معزولة من تربة صحراوية جزائرية (سيدي مستور الوادي).

تم عزل خمسة أنواع من الخمائر من عينة التربة الصحراوية. كما تم انتقاء هذه الأنواع باستعمال وسط PDA مزود بالنشاء بنسبة 4 %. أظهرت النتائج أن هناك 3 سلالات فقط لديها القدرة على تحليل النشاء.

أظهرت دراسة الخصائص المورفولوجية، الفيزيولوجية والبيوكيميائية أن هذه الأنواع الثلاثة تنتمي لنوع : *Candida glabrata* بالنسبة ل (S2)، *Rhodotorula mucilaginosa* بالنسبة ل (S3) و *Candida lusitanea* بالنسبة ل (S5).

أظهر التحليل البيوكيميائي لعصير التمر أنه غني بالسكريات (25.17 %), ولهذا يعتبر وسط ملائم لزراعة الخميرة المحللة للنشاء. تمت دراسة إنتاج إنزيم ألفا اميلاز في قارورات زجاج ذات سعة 200 مل تحتوي كل منها 50 مل من وسط الزرع (درجة الحرارة 30 ° و درجة حموضة 5).

تحت هذه الظروف، قُدرت كتلة الخلايا المنتجة ب 33.75 غ/ل و النشاطية الإنزيمية ب 2300 وحدة وذلك في اليوم الرابع من عملية الحضان للنوع *C. glabrata*. من جهة أخرى، المتابعة الحركية للنمو والإنتاج أظهرت أن إنتاج الإنزيم مرتبط بنمو الخميرة.

من خلال الدراسة المقارنة للأنواع الثلاثة من اجل إنتاج ألفا اميلاز تم انتقاء *C. glabrata* كأحسن سلالة منتجة مقارنة بالبقية.

أعطت التنقية الجزئية للإنزيم بواسطة الترسيب بسلفات الأمونيوم (60 %) نشاطية نوعية تقدر ب 78.88 وحدة/مغ مع درجة نقاوة مقدرة ب 2.73 مرة. ألفا اميلاز الناتج يعمل بشكل مثالي في درجة حموضة تقدر ب 6.0 و درجة حرارة تقدر ب 55 °. الدراسة الحركية للإنزيم المنتج من طرف *C. glabrata* والخاضع للتنقية الجزئية أعطت V_{max} (1016.26 μ g/ml) و K_m (0,27 mg/ml).

الكلمات المفتاحية: ألفا اميلاز، تنقية، خميرة، عصير التمر، *Candida glabrata*.

LISTE DES ABREVIATIONS

[C]: Concentration

°C: Degré Celsius

µg: Micro gram

A: Acidité titrable

C: Candida

CE: Conductivité électrique

cm: Centimètre

Fru: Fructose

g: gram

Gal: Galactose

Glu: Glucose

h: heure

HMF: hydroxy-méthylfurfural

I.N.R.A.A: Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

j: jour

KDa: Kilo Dalton

K_m: La constante cinétique de Michaelis

l: litre

M: Molaire

Mal: Maltose

min: minute

ml: millimètre

mS: millisiemens

N: Normalité

nm: nanomètre

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: potentiel d'Hydrogène

R: Rhodotorula

S: Souche

SAB: Sérum Albumine Bovine

Sach: Saccharose

SM: Solution mère

T°: Température

trs: Tours

U: Unité internationale ($\mu\text{g/ml}$)

Vit: Vitamine

V_{max}: La vitesse maximale

YCB: Yeast Carbon Base

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Morphologie des cellules de levure et des mycéliums	04
Figure 02	Division de cellules levuriennes par bourgeonnement	05
Figure 03	Cycle de reproduction de la levure	06
Figure 04	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase: domaine A en rouge, domaine B en jaune et domaine C en pourpre. Dans le centre catalytique, l'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune). Les structures vertes sont liées au site actif et les sites de liaison de surface	14
Figure 05	Schéma d'une datte et de son noyau	20
Figure 06	Technique d'isolement des souches levurienne	28
Figure 07	Etapes de préparation de sirop de datte	32
Figure 08	Test de sélection de souches amylolytiques sur PDA à 4 % d'amidon (après 48 h d'incubation à 30 °C et à pH 5)	42
Figure 09	Variation du pH de milieu au cours de la culture	48
Figure 10	Variation de la concentration des glucides au cours de la culture	50
Figure 11	Variation de la concentration des protéines au cours de la culture	51
Figure 12	Variation de la biomasse au cours de la culture	52
Figure 13	Variation de l'activité amylasique au cours de la culture	53
Figure 14	Effet du pH sur l'activité amylasique de <i>Candida glabrata</i>	56
Figure 15	Effet de la température sur l'activité amylasique de <i>Candida glabrata</i>	57
Figure 16	Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité amylasique de <i>Candida glabrata</i>	58
Figure 17	Effet de la concentration du substrat sur l'activité amylasique de <i>Candida glabrata</i>	59
Figure 18	Tracé de Lineweaver et Burk de l' α -amylase produite par <i>Candida glabrata</i>	60

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Classification des levures	07
Tableau 02	Les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des levures et leurs fonctions physicochimiques	09
Tableau 03	Comparaison des deux types métaboliques	10
Tableau 04	Les différentes nomenclatures d' α -amylase	13
Tableau 05	Principales caractéristiques des trois types de dattes	21
Tableau 06	Composition moyenne pour 100 g net de dattes communes	22
Tableau 07	Les compositions biochimiques de sirop de dattes	24
Tableau 08	Analyses physicochimiques du sol	40
Tableau 09	Types de sol en fonction de la conductivité électrique	40
Tableau 10	Isolement des souches de levures à partir d'échantillon de sol sur milieu gélosé "Sabouraud"	41
Tableau 11	Caractères macroscopiques des trois souches de levures sélectionnées	43
Tableau 12	Caractères microscopiques (X100) des souches sélectionnées	44
Tableau 13	Caractères biochimiques et physiologiques des souches sélectionnées	45
Tableau 14	Les caractéristiques physicochimiques et biochimiques du sirop de datte de variété Ghars	46
Tableau 15	Bilan de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium de l' α -amylase produite par <i>Candida glabrata</i>	54

SOMMAIRE

Dédicaces
Remerciements
Résumés
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux
Introduction

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Généralités sur les levures

I.1.1. Introduction.....	03
I.1.2. Historique.....	03
I.1.3. Définition.....	03
I.1.4. Habitats.....	04
I.1.5. Morphologie.....	04
I.1.6. Organisation et composition.....	05
I.1.7. Reproduction.....	05
I.1.7.1. La multiplication asexuée.....	05
I.1.7.2. La multiplication sexuée.....	05
I.1.8. Classification.....	06
I.1.9. Caractères physiologiques et biochimiques.....	07
I.1.9.1. Besoin nutritif.....	07
I.1.9.2. Métabolisme.....	09
I.1.9.3. Facteurs physicochimiques de croissance.....	11

I.1.10. Les applications des levures.....	11
I.1.10.1. Les levures et l'alimentation.....	12
I.1.10.2. Les levures et l'environnement.....	12
I.1.10.3. Prestations Médicales.....	12

Chapitre 2: L' α -amylase

I.2.1. Introduction.....	13
I.2.2. Définition.....	13
I.2.3. Nomenclature.....	13
I.2.4. Structure.....	14
I.2.5. Différentes origines.....	14
I.2.5.1. Origine animale.....	15
I.2.5.2. Origine végétale.....	15
I.2.5.3. Origine microbienne.....	15
I.2.6. Mode d'action.....	15
I.2.7. Caractéristiques de l' α -amylase.....	16
I.2.8. Applications de l' α -amylase.....	17

Chapitre 3: Datté

I.3.1. Définition.....	20
I.3.2. Classification des dattes.....	20
I.3.3. Composition biochimique.....	21
I.3.4. Formation et évolution des dattes.....	22
I.3.5. Valeur nutritive de datté.....	23

I.3.6. Sirop de date.....	24
I.3.6.1. Définition.....	24
I.3.6.2. Composition biochimique du sirop de dattes.....	24
I.3.6.3. Propriétés du sirop de datte.....	25
I.3.6.4. Utilisations de sirop da datte.....	26

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Isolement et sélection des souches levuriennes amylytique.....	27
II.1.1. Echantillonnage.....	27
II.1.2. Détermination des paramètres physicochimiques et biochimiques du sol	27
II.1.2.1. Mesure du pH.....	27
II.1.2.2. Humidité.....	27
II.1.2.3. Mesure de la conductivité électrique du sol.....	28
II.1.2.4. Mesure de la matière organique.....	28
II.1.3. Isolement des levures	28
II.1.4. Purification.....	29
II.1.5. Conservation.....	29
II.1.6. Sélection des souches amylytiques.....	29
II.2. Identification.....	29
II.2.1. Etude des caractères morphologiques cellulaires.....	29
II.2.1.1. Etude de caractères macroscopiques.....	29
II.2.1.2. Etude de caractères microscopiques.....	30
II.2.2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	30
II.2.2.1. Fermentation des sucres.....	30
II.2.2.2. Assimilation des composés azotés.....	31

II.3. Production de l'α-amylase.....	31
II.3.1. Milieu de base.....	31
II.3.2. Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte.....	33
II.3.2.1. Détermination du pH.....	33
II.3.2.2. Détermination du taux de cendres.....	33
II.3.2.3. Détermination d'humidité.....	33
II.3.2.4. Détermination de l'acidité titrable.....	33
II.3.2.5. Dosage des sucres totaux.....	34
II.3.2.6. Dosage des sucres réducteurs.....	34
II.3.3. Préparation d'inoculum.....	34
II.3.4. Conduite de la fermentation.....	34
II.3.5. Cinétique de production de l' α -amylase.....	35
II.3.5.1. Mesure du pH.....	35
II.3.5.2. Dosage des sucres totaux.....	35
II.3.5.3. Dosage des protéines.....	35
II.3.5.4. Mesure de la biomasse.....	35
II.3.5.5. Dosage de l'activité α -amylasique.....	36
II.4. Purification partielle de l'α-amylase et étude de leurs propriétés physicochimique.....	36
II.4.1. Purification partielle de l' α -amylase.....	36
II.4.1.1. Préparation de l'extrait brut.....	36
II.4.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	37
II.4.2. Etude de quelques propriétés physicochimiques de l' α -amylase partiellement purifiée.....	37

II.4.2.1. Effet du pH.....	37
II.4.2.2. Effet de la température.....	37
II.4.2.3. Effet de concentration d'enzyme.....	38
II.4.2.4. Effet de concentration de substrat.....	38
II.4.2.5. Détermination des constantes cinétique d'enzyme (K_m et V_{max}).....	38

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Isolement et sélection des souches levuriennes amylolytique.....	40
III.1.1. Analyses physicochimiques du sol.....	40
III.1.2. Isolement des souches levuriennes.....	41
III.1.3. Sélection des souches amylolytiques.....	42
III.2. Identification.....	43
III.2.1. Etude de caractères macroscopiques.....	43
III.2.2. Etude de caractères microscopiques.....	44
III.2.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques.....	44
III.3. Production de l'α-amylase.....	46
III.3.1. Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte.....	46
III.3.2. Cinétique de la production d' α -amylase.....	48
III.3.2.1. Evolution du Ph.....	48
III.3.2.2. Evolution de la concentration des glucides.....	50
III.3.2.3. Evolution de la concentration des protéines.....	51
III.3.2.4. Evolution de la biomasse.....	51
III.3.2.5. Evolution de l'activité amylasique.....	53
III.4. Purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l' α-amylase produite par <i>Candida glabrata</i>.....	54

III.4.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	54
III.4.2. Etude de quelques propriétés physico-chimiques de l' α -amylase partiellement purifiée.....	55
III.4.2.1. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme.....	56
III.4.2.2. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme.....	57
III.4.2.3. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique.....	58
III.4.2.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme.....	59
III.4.2.5. Détermination des constantes cinétique d'enzyme (K_m et V_{max}).....	60
Conclusion	61
Références bibliographiques.....	63
Annexe	

Introduction

Introduction

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**Ibukun et Akindumila, 1998; Abu et al., 2005**).

Dans ce contexte, les levures ont occupé une place primordiale dans des industries agroalimentaires. Ce sont des microorganismes eucaryotes et unicellulaires ayant des capacités à se multiplier rapidement car elles sont moins exigeantes en nutriments.

Par ailleurs, l'usage des préparations enzymatiques s'est considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. Les enzymes amylolytiques, les α -amylases en particulier, sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (**Little, 2004**).

L'intérêt pour les amylases fongiques (moisissures et levures), a augmenté ces dernières années, où plusieurs investigations sont menées sur les enzymes amylolytiques extracellulaires secrétées par les genres *Aspergillus*, *Rhysopus* (**Ait-kaki, 2004; Ramashandran et al., 2004**), *Lipomyces*, *Saccharomycopsis* et *Schwanniomyces* (**De mot et Verachtert, 1985**), *Penicillium* (**Nouadri, 2011**), *Schwanniomyces* (**Benaouida, 2008**), *Lipomyces* (**Merabti, 2006**).

La production industrielle des enzymes porte surtout sur les amylases et les protéases qui représentent 80 % du marché mondial des enzymes (**Morvan, 2010**).

En Algérie, les α -amylases utilisées dans diverses industries (panification, biscuiterie, amidonnerie...etc) sont importées en totalité, ce qui nécessite la création des ateliers locaux pour la production de ces enzymes.

Toutefois, la production d' α -amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vu composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d' α -amylase, d'autre part (**Zoubiri, 2012**).

Dans cette étude portant sur la production d' α -amylase, on a choisi les levures comme agents de fermentation, vu à leur place importante sur le marché des enzymes amylolytiques et leur remarquable capacité à coloniser et à exploiter une grande variété de substrats (**Leveau et Bouix, 1993; Boiron, 1996**).

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes (**Dubey et al., 2000**). La datte de part de leur grande richesse en sucres, peuvent servir en tant que matière première en fermentation pour la production de divers métabolites (**Benahmed, 2007**).

L'utilisation de sirop de datte de variété Ghars comme un milieu de base pour la culture des microorganismes a augmenté ces dernières années, où plusieurs travaux sont les utilisés, **Merabti (2006)** a utilisé ce milieu pour la culture des levures de genre *Lipomyces*, **Bacha (2008)** et **Kemassi (2015)** pour *Saccharomyces*, **Zoubiri (2012)** pour *Rhizopus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Helminthosporium*.

Cependant, l'enrichissement du milieu s'avère nécessaire afin de constituer un milieu équilibré et favorable au développement des levures (**Merabti, 2006**).

Notre étude consiste donc à produire de l' α -amylase par *des souches levuriennes isolés à partir de sol saharien algérien et* cultivé sur un milieu à base de datte.

Le présent travail a pour principaux objectifs, l'isolement et la sélection des souches productrices d' α -amylase d'une part, et l'identification phénotypique de ces souches d'autre part.

Par ailleurs, une étude cinétique de la production de l' α -amylase par les souches sélectionnées sera entreprise. Elle sera suivie par une purification partielle, afin d'étudier quelques propriétés physicochimiques nécessaires pour une éventuelle application de cette enzyme.

Partie I
Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur les levures

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Généralités sur les levures

I.1.1. Introduction

Les champignons sont des organismes eucaryotes, immobiles et dépourvus de pigment assimilateur (**Pramayon, 2001**). Ils ont une paroi constituée de chitine, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine (**Carlile et Watkinson, 1994**).

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories: la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (**Redecker, 2002**), constituant quatre principaux groupes qui diffèrent par la structure de leur mycélium et de leur organe reproducteur: zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes (**Delal, 2016**) riche de quelques 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiés, adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique. Ils se reproduisent par des spores, selon un mode asexué et/ou sexué (**Boiron, 1996; Bouchet et al., 1999**).

I.1.2. Historique

Les levures ont été utilisées par l'homme depuis des millénaires, sans le savoir, en particulier dans la fabrication de boissons alcoolisées et de pain. Ce n'est qu'avec les travaux de **Pasteur (1866-1876)** que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence (**bourgeois et leveau, 1991**). A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de **Büchner**. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**Benaouida, 2008**).

I.1.3. Définition

Le mot levure, selon **Phaff et al. (1968)**, provient du mot latin «levare» qui se traduit par «soulever», type de cellules de champignons. Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leurs caractères unicellulaires et l'absence d'un vrai mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (**Guiraud, 1998**). Elles présentent un grand intérêt dans la ration alimentaire de l'homme, c'est pour cela qu'elles ont un grand nombre d'applications dans les industries agroalimentaires (**Larpent, 1990**).

I.1.4. Habitats

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (**Bouix et Leveau, 1991**). D'autres, se développent au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton (**Merabti, 2006; Van Uden et Fell, 1968**). Par ailleurs, une large variété de levures vit à la surface des plantes sous forme de poudre blanche (**Tortora et al., 2003**), des champignons et des animaux.

I.1.5. Morphologie

Les levures sont des champignons unicellulaires. Les cellules sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques, allongées, apiculées ou de formes plus spécifiques: ogivales (genre *Dekkera*), en forme de bouteille (*Pityrosporum, Malassezia*), triangulaires (*Trigonopsis*) ou en forme de citron (*Hanseniaspora*) (**Hencké, 2000**). Elles se distinguent des bactéries par leur taille qui est très variables selon les espèces, elle varie de 2 à 20 μm de longueur et de 1 à 10 μm de largeur (**Bouras et al., 2006**). Les levures sont de grande taille par rapport aux bactéries ce qui rend possible l'examen direct. La masse cellulaire des levures est 100 fois plus grande que celle des bactéries (**Hencké, 2000**).

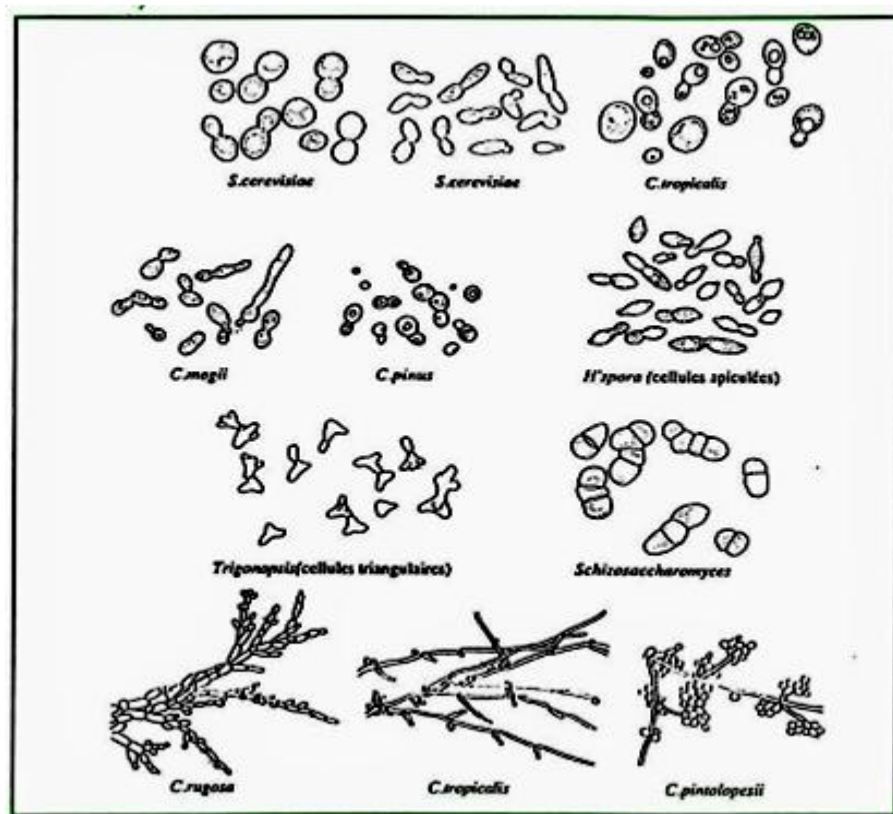


Figure 01: Morphologie des cellules de levure et des mycéliums (Leveau et Bouix, 1993).

I.1.6. Organisation et composition

La structure cellulaire est de type eucaryote. La paroi rigide est de 15 à 230 nm d'épaisseur.

La composition de la paroi est la suivante:

- 80 % de polysaccharides antigéniques (mannanes, β -glucanes, polyosides hétérogènes) et 1 à 2 % de chitine (**Hencké, 2000**);
- 7 à 10 % de lipides et 5 % de minéraux (**Larpen et al., 1997**).

Le noyau est entouré d'une membrane qui persiste pendant la division cellulaire, le nombre de chromosomes est variable suivant les levures (**Bacha, 2008**).

Le cytoplasme est le siège de l'activité métabolique, il renferme en plus des organites cellulaires, des ribosomes, des enzymes, des polyphosphates, du glycogène et du tréhalose. Le noyau renferme plusieurs chromosomes, c'est le noyau qui dirige l'activité cellulaire (**Cherif, 1993**).

I.1.7. Reproduction

Les levures sont capables de se multiplier selon deux modes différents:

I.1.7.1. La multiplication asexuée: Le bourgeonnement représente le mode de reproduction végétatif le plus courant chez les levures (**Bouras et al., 2006**). Aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées (et rarement par scissiparité). Peut être aussi multilatéral, ce qui est une caractéristique de *Saccharomyces* et *Debaryomyces* (**Hencké, 2000**).

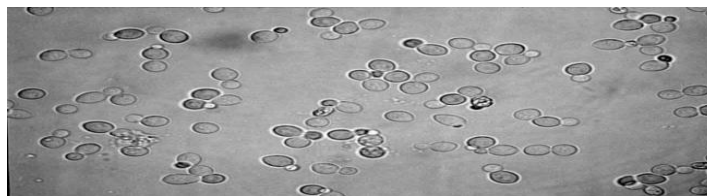


Figure 02: Division de cellules levuriennes par bourgeonnement (Leclerc et al., 1995).

I.1.7.2. La multiplication sexuée: Dans ce cas de reproduction, deux noyaux haploïdes provenant de deux spores se réunissent pour former un zygote diploïde qui à son tour se multiplie infiniment par voie végétative. Dans les conditions favorable, le zygote subit une méiose ou les quatre noyaux haploïdes forment quatre ascospores donnant plus tard des cellules haploïdes (**Bouras et al., 2006**).

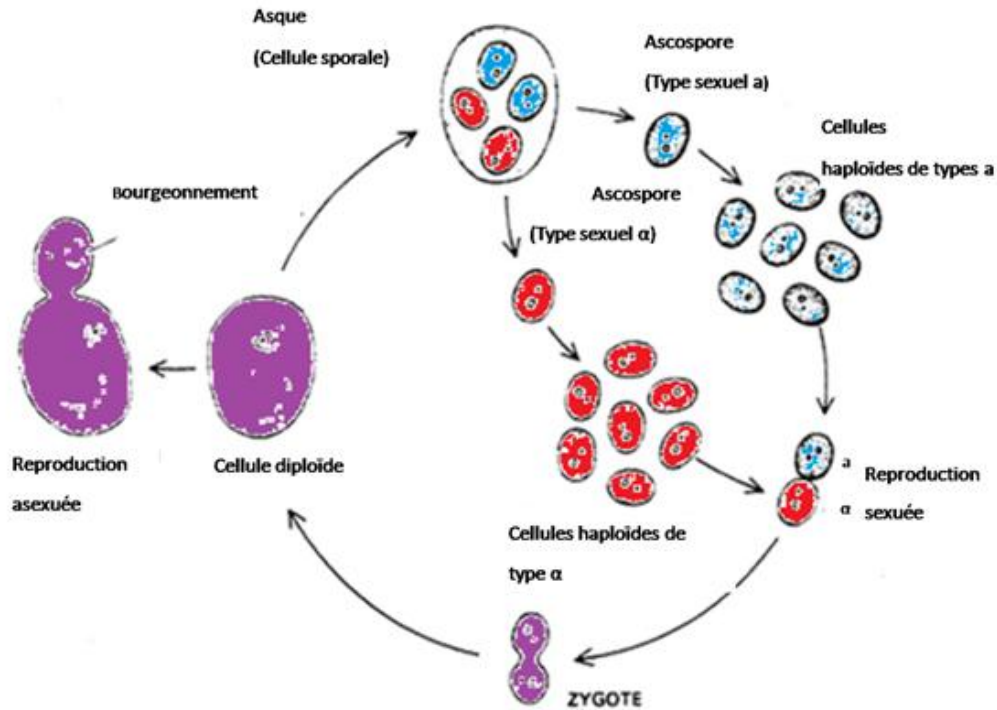


Figure 03: Cycle de reproduction de la levure (Guinet et *al.*, 1994).

I.1.8. Classification

La classification des levures évolue constamment entre 1952, 1970 et 1984 (Kreger van), près de la moitié des espèces ont changé de position ou de dénomination. La dernière classification en 1990, elle a été réalisée par Barny et *al.* (Galzy et *al.*, 1996). Les levures se divisent en trois grandes classes:

- **Levures Ascomycètes (Hémiascomycètes):** Se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose (Meyer et *al.*, 2004);
- **Levures Basidiomycètes:** Sont parfois classées parmi les Deuteromycota. A l'issue d'une reproduction sexué, sont formées des exo-spores ou «basidiospores» portées par une baside (Hencké, 2000);
- **Levures Deutéromycètes:** Regroupent l'ensemble des levures, ne présentant pas de mode connu de reproduction sexué, ne se multipliant que par reproduction végétative (Benaouida, 2008).

Il en existe environ 500 espèces regroupées en 60 genres (Labrecque, 2003) classification éditée par Kreger van (1984). Le détail de la classification est représenté dans le tableau 01.

Tableau 01 : Classification des levures (Kreger van, 1984)

Classes	Ordres	Familles	Genres
Ascomycètes	Endomycétales	<i>Spermophthoraceae</i> <i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Coccidiascus</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Nematospora</i> <i>Schizosaccharomyces</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomycodes</i>
Basidiomycètes	Ustilaginales Tremellales	<i>Filobasidaceae</i> <i>Levures à téliosporos</i> <i>Sirobasidiaceae</i> <i>Tremellaceae</i>	<i>Chionosphaera</i> <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospordium</i>
Deuteromycètes	Blastomycetales	<i>Cryptococcaceae</i> <i>Sporobolomycetaceae</i>	<i>Aciculoconidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Kloeckera</i> <i>Malassezia</i> <i>Oosporidium</i>

I.1.9. Caractères physiologiques et biochimiques

I.1.9.1. Besoin nutritif

La croissance est une période d'interactions entre la cellule et l'environnement qui apporte les éléments nécessaires et qui est modifié par le métabolisme des cellules (**Leveau et al., 1993**).

➤ Besoins en carbone (glucides)

Le carbone constitue 50 % du poids sec de la levure (**Leveau et al., 1993**). Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie, de carbone et d'hydrogène. Les levures ont besoin de glucides mais elles peuvent également en produire (tréhalose, glycogène). La capacité des levures à utiliser les sucres varie. Les plus fréquemment utilisés sont: sucres simples (glucose, galactose), disaccharides (saccharose, maltose, lactose) et trisaccharides (raffinose), mais aussi pentoses (fructose) et polysaccharides (**Hencké, 2000**).

➤ **Besoins en azote**

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**Guiraud, 1998; Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997**). Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions d'ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques) (**Benaouida, 2008**).

➤ **Besoins en eau**

La plupart des levures nécessitent entre 90 et 95 % d'humidité relative, mais certaines peuvent se développer à moins de 65 %, ce sont les levures «osmophiles» (**Hencké, 2000**).

➤ **Minéraux, oligo-éléments et vitamines**

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires de très faibles concentrations (**Boiron, 1996; Larpent et Sanglier, 1992**).

Les minéraux ont un rôle plastique (pour l'édification des cellules), et fonctionnel (ce sont des facteurs de croissance).

Les Oligo-éléments (Al, Cr, Br., Cu, Pb, Mn, Ag, Sr, Zn, Sn...) sont nécessaires à l'état de traces (**Hencké, 2000**), mais ils jouent un rôle primordial dans l'activation de certaines réactions enzymatiques. Ainsi dans la constitution de certaines vitamines et des coenzymes (**Bouras et al., 2006**).

Certaines d'entre elles ont également besoin d'un ou plusieurs vitamines comme par exemple la thiamine (vitamine B₁), biotine (vitamine B₈), inositol (vitamine B₇), acide pantothénique (vitamine B₅) (**Bouzegag, 2007**) et d'autres facteurs de croissance.

Tableau 02: Les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des levures et leurs fonctions physicochimiques (Bouras et *al.*, 2006).

Eléments	Fonction physicochimiques
Hydrogène (H)	Constituant de l'eau et des composants de la cellule donneuse d'électrons
Carbone (C)	Constituant des composants cellulaires, donne d'électrons (respiration), accepteur d'électrons (fermentation)
Azote (N)	Constituants des protéines, enzymes et acides nucléiques. Donneur d'électrons (bactéries nitrifiantes). Accepteur d'électrons (bactéries dénitrifiantes).
Soufre (S)	Constituants des protéines et de coenzyme A. Donneur et accepteur d'électrons chez les sulfobactéries.
Phosphore (P)	Constituant des acides nucléiques, phospholipides et des certaines coenzymes, formation de l'ATP.
Magnésium (Mg)	Cofacteur de réaction enzymatique (ATP). Laissons des enzymes aux substrats.
Fer (Fe)	Constituent des cytochromes. Cofacteur des réactions enzymatiques.
Potassium (K), Zinc (Zn), cuivre (Cu), manganèse (Mn), cobalt (Co), molybdène (Mo), calcium (Ca).	Cofacteur ou constituant de certaines enzymes.

I.1.9.2. Métabolisme

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés.

Selon la voie empruntée, on peut diviser les levures en deux groupes:

- ✓ **Les aérobies strictes:** Leur métabolisme est exclusivement respiratoire et elles sont incapables d'utiliser le glucose en l'absence d'oxygène (**Tchango Tchango, 1996**);
- ✓ **Les aéro-anaérobies facultatives:** Qui regroupent la plupart des levures (**Leveau et Bouix, 1993**). Dans ce cas on distingue deux sous-catégories:

A. Levures de type respiratoire (en aérobie): Il s'agit d'une oxydation complète du glucose (Regnault, 1990). Toute l'énergie biochimique potentielle contenue dans le glucose étant libérée, la levure peut, non seulement assurer son maintien en vie, mais aussi synthétiser la matière organique donc entrer en croissance et se multiplier (Hencké, 2000).

B. Levures de type fermentaire (en anaérobie): L'oxydation du glucose est incomplète, on parle de fermentation ou de «vie sans air» (définition de Pasteur). On estime à 93 - 95 %, le glucose dégradé en CO₂ et éthanol et à 5 % le glucose servant à la formation de glycérol, d'acides organiques, d'aldéhydes, d'esters et d'alcools supérieurs, ainsi que la biomasse elle même (Hencké, 2000).

Cette distinction entre les types fermentaires et respiratoires ne s'applique qu'à la croissance en aérobiose sur glucose, fructose et mannose car les autres sucres interviennent dans des répressions enzymatiques (Leveau et Bouix, 1993; Tchango Tchango, 1996).

Tableau 03 : Comparaison des deux types métaboliques (Hencké, 2000).

	Type respiratoire	Type fermentaire
	Levures préférant un métabolisme respiratoire en aérobiose	Levures préférant un métabolisme fermentaire même en aérobiose
Utilisation du glucose en aérobiose	< 30 %	> 90 %
Transformation totale du glucose en	CO ₂ et H ₂ O	Ethanol
Rendement énergétique	Elevé	Faible
Utilisation du glucose dans la synthèse de biomasse	Peu	Importante
Exemples	La majorité des levures	<i>Saccharomyces</i> , <i>Schiosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> , et <i>Kloeckera</i>

Comme tous les organismes lui ont à leur disposition plusieurs modes de production d'énergie, les levures font appel de préférence à la respiration aérobie quand l'oxygène est disponible, car ce type de respiration est plus efficace sur le plan du rendement énergétique (Regnault, 1990).

I.1.9.3. Facteurs physicochimiques de croissance

➤ Température

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30 °C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels **(Leveau et Bouix, 1993)**. En effet, la température maximale de croissance peut se situer entre 35 et 45 °C. D'autres levures peuvent se développer à 0° C **(Oteng-Gyang, 1984)**.

➤ pH

Le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites **(Larpent, 1990)**. Les levures présentent une tolérance élevée aux pH extrêmes. Elles tolèrent des gammes très larges allant de 2.4 à 8.6. Entre ces valeurs, le pH intracellulaire est compris entre 5.8 et 6.8 **(Bouix et Leveau, 1991)**. Cependant, **Phaff et ses collaborateurs (1978)** ont noté que la plupart des levures connues, ont une bonne croissance à des pH proches de 3.

➤ CO₂

Lorsque la concentration en CO₂ du milieu atteint un taux de saturation. Au bout de quelques heures la fermentation s'arrête **(Laisne et al., 1972)**. La croissance des levures peut être partiellement inhibée. Dans ces conditions, on observe notamment une diminution de la teneur en esters d'acétate **(Bouzegag, 2007)**.

➤ Aération

Elle a pour but d'une part d'apporter l'oxygène nécessaire à la croissance des levures et d'autre part d'homogénéiser et d'assurer la circulation du moût dans le fermenteur. Cependant, il est intéressant de rappeler que la levure boulangère s'adapte à deux modes de vie, en présence ou en absence d'oxygène **(Noui, 2001)**.

I.1.10. Les applications des levures

Par rapport aux bactéries, les levures présentent des éléments favorables quant à leur utilisation en biotechnologie environnementale. Un avantage majeur pour la dégradation de solvants organiques volatils est leur tolérance à l'acidité **(Labrecque, 2003)**.

I.1.10.1. Les levures et l'alimentation

Les levures présentent un grand intérêt dans la ration alimentaire de l'homme, c'est pour cela qu'elles ont un grand nombre d'applications dans les industries agroalimentaires (**Larpent, 1990**).

Les utilisations traditionnelles, telles que le cidre et les autres boissons alcoolisées, des produits à base de soja (sauce de soja), le pain et les produits laitiers (fromage, kéfir) sont connues par la majorité des gens. Les levures ont bien d'autres utilités dans le domaine biotechnologique (**Phaff et al., 1978**). Elles permettent aussi la production de métabolites par exemple, les acides gras à longue chaîne produits par les levures sont une base pour la synthèse de parfums synthétiques (**Labrecque, 2003**), et du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (**Leclerc et al., 1995; Scriban, 1984**).

La production de gamma-décalactone par *Yarrowia lipolitica* permet d'obtenir un composé aromatique ayant une plaisante odeur de pêche (**Pagot et al., 1997**).

I.1.10.2. Les levures et l'environnement

Depuis la suggestion de **Davis et Updegraff (1954)** touchant la possibilité de produire des aliments par des microorganismes à partir d'hydrocarbures, un intérêt marqué pour l'assimilation des hydrocarbures par les levures fit son apparition dans la littérature (**Komagata et al., 1964**). Depuis la majorité des études sur le bio-traitement d'effluents contaminés par des hydrocarbures ont préconisé l'utilisation de microorganismes (**Labrecque, 2003**).

I.1.10.3. Prestations Médicales

Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex: production des protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (**Blin, 2002; Mercier, 1997**).

Chapitre 2: L' α -amylase

Chapitre 2: L' α -amylase

I.2.1. Introduction

L' α -amylase est considérée l'une des enzymes industrielles la plus importante (**Gupta et al., 2008**). C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1 $\rightarrow$ 4) de l'amidon (**Nouadri, 2011**).

Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes (**Janecek, 1994**). Bien que les α -amylases de différentes origines aient très peu de séquences d'acides aminés identiques, leurs structures tridimensionnelles et l'organisation de leurs sites actifs sont similaires. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites pouvant accueillir chacun un résidu glucose dont le nombre varie selon l'origine de l'enzyme (**Nouadri, 2011**).

I.2.2. Définition

L' α -amylase (E.C.3.2.1.1) est une endoenzyme qui hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1 $\rightarrow$ 4) D-Glucose (**Franco et al., 2000**). Elle conduit à la formation du D-glucose, de maltose et d'une petite quantité de maltodextrines (**Nouadri, 2011**). Chez les mammifères, l' α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Celle d'origine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exocellulaire, exceptées certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pishia burtonii* (**Messaoudi et Bekkari, 2016**).

I.2.3. Nomenclature

Le tableau 04 récapitule les différentes nomenclatures d' α -amylase (**Benaouida, 2008**).

Tableau 04: Les différentes nomenclatures d' α -amylase (Benaouida, 2008).

Nom codifié	E.C .3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase
Nom systématique	α (1 $\rightarrow$ 4) D-glucane glucanohydrolase
D'autres nom (s)	Glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin.

I.2.4. Structure

L' α -amylase fongique est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C). Elle renferme une partie glucidique associée chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec quatre ou cinq ponts disulfures (**Benaouida, 2008**).

Le domaine central A, forme un tonneau (β/α)₈ qui contient huit feuillés β plissés et qui se disposent de façon parallèle et de huit hélice α , il porte le site actif à la partie C-terminale des feuilletts β . Le domaine B est formé d'une boucle de soixante-quatre résidus d'acide aminé reliant A- β_3 avec A- α_3 et constitue une sorte de «couvercle» au-dessus du site actif. Alors le domaine C est constitué d'un tonneau de huit feuilletts β antiparallèles (**Souza et al., 2010**).

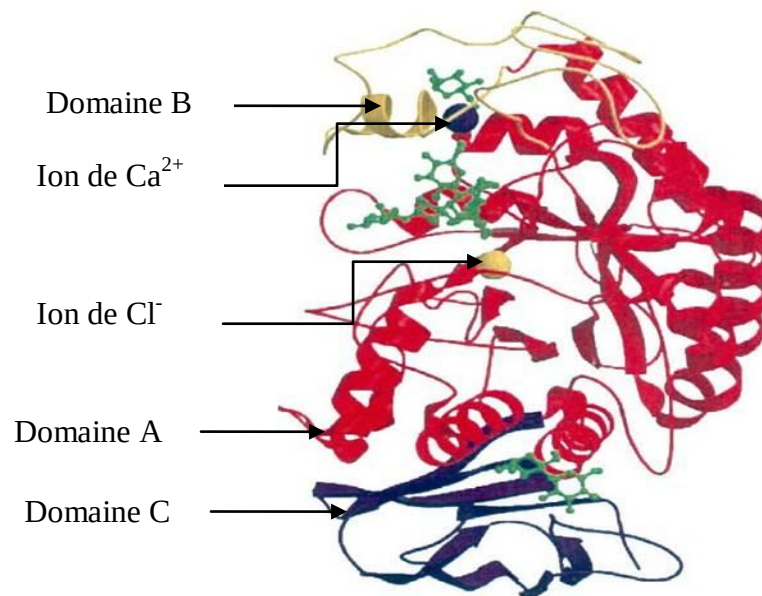


Figure 04: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase: domaine A en rouge, domaine B en jaune et domaine C en pourpre. Dans le centre catalytique, l'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune). Les structures vertes sont liées au site actif et les sites de liaison de surface (Souza et al., 2010).

I.2.5. Différentes origines

L' α -amylase est une enzyme ubiquitaire, obtenu par extraction à partir de cellules végétales et animales ou par fermentation par des cellules microbiennes (**Brozozwski et Davies, 1997**). Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (**Haq et al., 2002**).

I.2.5.1. Origine animale: L' α -amylase animale est généralement extrait de la salive humaine et du pancréas des mammifères (**Chatterton et al., 1996**). Cependant, la difficulté réside dans l'approvisionnement de la matière première (organe difficile à collecter) et le coût de l'extraction (**Saci, 2012**).

I.2.5.2. Origine végétale: Les α -amylases jouent, chez les plantes, un rôle important dans le métabolisme glucidique, où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs (glucose et maltose) directement assimilables, qui sont la source énergétique nécessaire à la germination (**Nouadri, 2011**). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales. Elles sont souvent formées au cours de la germination des grains (**Benaouida, 2008**), qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (**Brawn et Kelly, 1993**).

I.2.5.3. Origine microbienne: Deux types sont distingués, les α -amylases bactériennes et les α -amylases fongiques:

- **Les α -amylases bactériennes:** Ce type d'enzymes est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées* (**Zoubiri, 2012**). De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons α (1 $\rightarrow$ 4) (**Nouadri, 2011**).
- **Les α -amylases fongiques:** La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques, parmi les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps du fait que la première production d' α -amylase a été réussie par **Takamine en 1894**. L' α -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50 et 55 °C. Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et *Alternaria* ont été utilisés pour la production d' α -amylase relativement thermostable (**Ait Kaki et al., 2012**). En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l' α -amylase (**Saci, 2012**).

I.2.6. Mode d'action

Les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés d'enzyme qui varient d'une souche à une autre (**Fogarty et al., 1990**).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat (**Parkc et al., 1997**).

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme selon des conditions expérimentales tell que: température, pH, taille et structure du substrat (**Mazur et Nakatani, 1993**).

I.2.7. Caractéristiques de l' α -amylase

Pour qu'une enzyme réponde aux exigences potentielles en vue d'une production industrielle, il est nécessaire de déterminer leurs propriétés (**Nouadri, 2011**).

➤ Spécificité de substrat

Le substrat naturel de l' α -amylase est l'amidon (**Pandey et al., 2000**). La production d' α -amylase par certaines souches fongiques (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.* et *Penicilium sp.*) est contrôlée par l'amidon, il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (**Nouadri, 2011**).

➤ Poids moléculaire

Le poids moléculaire des α -amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40 et 90 KDa (**Schomburg et Salzmann, 1991**). Celui des α -amylases levuriennes, varie entre 40 et 70 KDa (**Benaouida, 2008**).

➤ Température optimale

La température optimale varie avec l'espèce et l'origine de l'enzyme, généralement les α -amylases ont une température optimale comprise entre 40 et 70 °C. En effet, Les α -amylases bactériennes ont une plus grande stabilité thermique par apport aux amylases fongiques. La température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50 à 95 °C alors que celle des α -amylases fongiques varie entre 40 à 60 °C. L' α -amylase levurienne a des températures maximales, allant de 40 à 60 °C et parfois même 70 °C pour certaines espèces comme *Lypomyces starkeyi* (**Benaouida, 2008**).

➤ **pH optimum**

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les amylases bactériennes. Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (**Merabti, 2006**).

➤ **Effecteurs**

Les amylases sont des métalloprotéines absolument dépendantes du Ca^{2+} qui est vraisemblablement un activateur allostérique (**Egas et al., 1998**). Le calcium ne participe pas directement à la formation de complexe enzyme-substrat mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation thermique (le maintien de sa structure tertiaire) et de la dénaturation acide vis à vis de la protéolyse (**Ferhat Hamida et Laklouka, 2015**).

L'activité enzymatique de l' α -amylase n'est pas modifiée par les ions K^+ , Na^+ , NH_4^+ mais elle est fortement inhibée par l'EDTA (agent chélateur du calcium), l'urée 8 M, certains composants amides, l'acide formique, l'acide oxalique, l'acide lactique, l'acide citrique et les métaux lourds, par contre, l'acide acétique stimule l' α -amylase.

Cependant les ions Cl^- , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} et Fe^{2+} sont également des activateurs de l' α -amylase (**Schomburg et Salzmann, 1991**). De plus, l'histidine, le mercaptoéthanol, le dithiotriitol sont aussi considérés comme des activateurs (**Merabti, 2006**).

1.2.8. Applications de l' α -amylase

Le secteur industriel présente une très grande diversité de techniques et de produits. Il offre aux enzymes hydrolytiques un large champ d'utilisation.

Actuellement, les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels: industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermostabilité. Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre de l'application de l' α -amylase s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique (**Pandey et al., 2000**).

➤ Glucoserie

La principale industrie utilisatrice de l' α -amylase est la glucoserie qui à partir d'un substrat complexe, l'amidon, développe un nombre important de transformations faisant appel aux enzymes, parmi lesquelles les α -amylases bactériennes ou fongiques qui sont utilisées pour la dégradation de l'amidon (**Nouadri, 2011**).

➤ En sucrerie

L' α -amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. De plus, des α -amylases fongiques sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (**Van der maarel et al., 2002**).

➤ Biscuiterie et panification

L'usage de l' α -amylase «améliorant de panification» est devenue une pratique de fabrication machinal dans l'industrie panaire, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus de fabrication ce qui conduit à un gain en temps et en énergie (**Pandey et al., 2000**).

➤ Industrie des boissons

Dans ce secteur l' α -amylase fongique intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits (**Mamo et Gessesse, 1999**). En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrines, dites bières à basses colories.

➤ En textile

Désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage (**Zoubiri, 2012**).

➤ Détergents

Dégradation des taches à base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, ce qui facilite le découpage physique de la tache (**Zoubiri, 2012**).

➤ **Domaine médical**

Dans le domaine médical, le taux de l' α -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies: insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (**Pandey et al., 2000**).

➤ **Domaine pharmaceutique**

Les α -amylases fongiques sont utilisées comme:

- ✓ Aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple: Danilase;
- ✓ Agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique (**Nouadri, 2011**).

Chapitre 3: Datte

Chapitre 3: Datte

I.3.1. Définition

La datte est le fruit de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) qui fait partie de la grande famille des palmacées (Zoubiri, 2012). Ces fruits sont des baies de forme ovale de 3 cm de long (Sbiai, 2011), et d'un poids de 2 à 8 g selon les variétés. La couleur de datte dépend de la variété et va du jaune au presque noir en passant par toute la gamme des bruns (Tonelli et Gallouin, 2013).

Richard (1972), décrivait la datte comme étant une baie constituée de deux parties; une partie comestible représentée par la chair ou pulpe et une partie non comestible représentée par la graine ou noyau ayant une consistance dure.

La partie comestible dite chair ou pulpe est constituée de:

- ✓ Un épicarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau;
- ✓ Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue;
- ✓ Un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (Espiard, 2002).

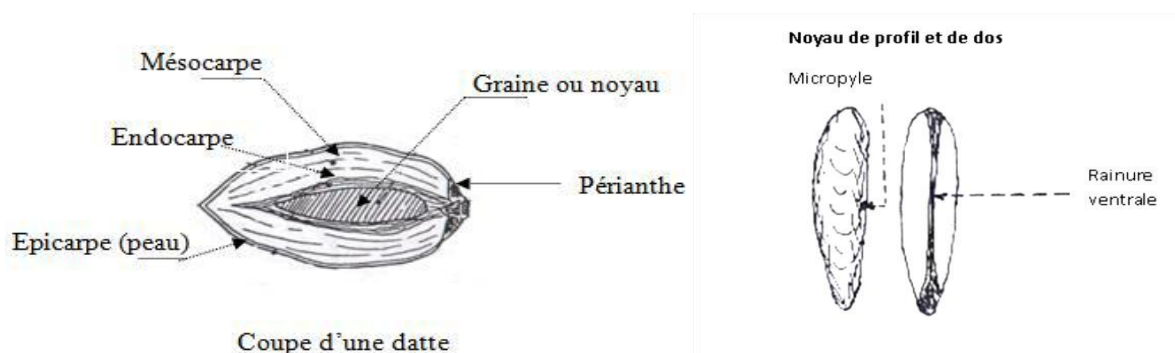


Figure 05: Schéma d'une datte et de son noyau (Djouidi, 2013).

I.3.2. Classification des dattes

Les dattes sont classées en trois catégories d'après leur consistance (Noui, 2007). Celle-ci dépend de la teneur en eau de la pulpe. La stabilité de la datte dépend de la proportion de sucres par rapport à la teneur en eau (Munier, 1973). Les rapports (sucres totaux/eau) appelés aussi indices de qualité ou de dureté permettent de connaître le degré de stabilité et d'apprécier l'aptitude à la conservation des dattes (Messaoudi et Bekkari, 2016).

Les trois catégories des dattes sont:

- ✓ **Les dattes molles:** Ayant un indice de dureté inférieur à 2. Taux d'humidité supérieur ou égal à 30 %, elles sont à base de sucres invertis (fructose, glucose) tel que Ghars, Hamraia, Litima...etc (**Amellal née Chibane, 2008**);
- ✓ **Les dattes demies molles:** Dont l'indice de dureté inférieur, est compris entre 2 et 3,5 (**Munier, 1973**). De 20 à 30 % d'humidité, elles occupent une position intermédiaire, datte à base de saccharose par excellence;
- ✓ **Les dattes sèches:** Présentent un indice de dureté supérieur à 3,5, avec moins de 20 % d'humidité, riche en saccharose. Elles ont une texture farineuse telle que Meche-Degla, Degla Beida.....etc (**Ben Abbes, 2011**).

Le tableau 05, résume les principales caractéristiques de chaque type de ces dattes.

Tableau 05: Principales caractéristiques des trois types de dattes (Siboukeur, 1997).

Type de date	Teneur en eau	Teneur en sucres réducteurs	Teneur en Sach	Couleur de pulpe	Goût	Conservation
Sèche			Teneur élevée	Clair blanche	Acidulé	Très bonne
Demi molle	Teneur moyenne	Teneur moyenne	Teneur moyenne	Marron Clair	Parfumé	Bonne
Molle	Teneur élevée	Teneur élevée		Marron noir	Très parfumé	Faible

I.3.3. Composition biochimique

La partie comestible représente 80 à 95 % du poids de la datte, elle est très riche en sucre, ce qui lui donne un très grand pouvoir énergétique (**Benagga et Gougui, 2014**), elle est également riche en éléments minéraux et substances vitaminiques. Mais les sucres et l'eau restent les éléments majeurs pour la consistance de la chair (**Dollé et Toutain, 1990**).

La teneur et la proportion des sucres varient en fonction du climat et du stade de maturation de la datte, comme elles varient aussi selon les variétés (**Zidani, 2009**) et leur consistance dont les limites de 50 à 80 % de la pulpe fraîche (**Favier et al., 1993**). De façon générale, les dattes molles sont caractérisées par une teneur élevée en sucres réducteurs (sucres invertis), et les dattes sèches par une teneur élevée en saccharose (**Belguedj, 2015**).

Tableau 06: Composition moyenne pour 100 g net de dattes communes (Benahmed, 2007).

Composants	Quantité en g (100 g de datte communes)
Glucides	69.0
Protides	2.5
Lipides	0.1
Fibres alimentaire	7.1
Les minéraux et oligoéléments	1.5 à 1.8
Eau	70 à 80 dans la datte fraiche et 10 à 40 dans la datte sèche
Apports énergétiques	287.0 K Calories/1200 K joules
Vitamines	(mg)
Vitamine C	2
Provitamine A	0.03
B ₁	0.06
B ₂	0.10
B ₃	1.7
B ₅	0.80
B ₆	0.15
B ₉	0.028

I.3.4. Formation et évolution des dattes

Les fleurs fécondées, à la nouaison, donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (**Gilles, 2000**).

La datte passe par différents stades d'évolution:

- ❖ **Hababouk (Loulou):** C'est le stade "nouaison" qui vient juste après la pollinisation. Les dattes ont une croissance lente, une couleur verte jaunâtre et une forme sphérique. Il dure quatre à cinq semaines après fécondation (**Munier, 1973**);
- ❖ **Kimiri (Kh'lal):** Ce stade dure sept semaines environs, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins;

- ❖ **Khalal (Besr):** Les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge et au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade. Il dure en moyenne quatre semaines;
- ❖ **Routab (Martouba):** La couleur jaune ou rouge du stade khalal passe au foncée ou au noir. Ce stade se caractérise par:
 - ✓ La perte de la turgescence du fruit suite à la diminution de la teneur en eau;
 - ✓ L'insolubilisation des tanins qui se fixent sous l'épicarpe du fruit;
 - ✓ L'augmentation de la teneur des monosaccharides (**Retima, 2015**).

Ce stade dur de deux à quatre semaines.

- ❖ **Tamr:** C'est le stade final de la maturation de la datte. Le fruit perd beaucoup d'eau, ce qui donne un rapport sucre/eau élevé. Au cours de cette phase, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose) (**Ben Abbes, 2011**).

I.3.5. Valeur nutritive de datte

La datte a toujours été, depuis des temps immémoriaux, un élément très important de l'alimentation tant pour les humains que pour les animaux, dans toutes les contrées sud et l'est du la méditerranée (**Dollé et Toutain, 1990**), donc la datte constitue un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique (**Gilles, 2000**):

- ✓ La forte teneur en sucres confère à ces fruits une grande valeur énergétique;
- ✓ Une teneur intéressante en sucres réducteurs facilement assimilables par l'organisme;
- ✓ Les protéines de la datte sont équilibrées qualitativement, mais en faible quantité;
- ✓ Un apport important en éléments minéraux. Les dattes sont riches en minéraux plastiques (Ca, Mg, P, S) et en minéraux catalytiques (Fe, Mn) (**Bacha, 2008**);
- ✓ Elles sont reminéralisantes et renforcent notablement le système immunitaire;
- ✓ Le profil vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables en vitamines groupe B. Ce complexe vitaminique participe au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (**Djouab, 2007**).

I.3.6. Sirop de date

I.3.6.1. Définition

Le sirop de dattes (localement appelé Robb) est le sous produit de dattes le plus connu. Il est obtenu par l'extraction et concentration de jus de dattes (**Benharzallah et Bouhoureira, 2014**).

Ils présentent une coloration ambrée plus au moins foncée. Ils sont limpides, ce qui permet d'éviter d'avoir recours aux procédés de clarification (**Messaoudi et Bekkari, 2016**).

I.3.6.2. Composition biochimique du sirop de dattes

Le sirop de dattes comporte une qualité très importante des sucres principalement le fructose et le glucose (**Al-hooti et al., 2002**).

D'après **Alkhateeb (2008)**, les compositions biochimiques moyenne de sirop de dattes est représentée dans le tableau 07:

Tableau 07: Les compositions biochimiques de sirop de dattes (Alkhateeb, 2008).

Composants	Valeur
Teneur en eau (%)	16
Cendres (%)	6.8
Solides totaux sur le poids sec (%)	84.0
Sucres totaux (%)	79.45
Sucres réducteurs (%)	4.87
Sucre inverti (%)	74.83
Protéines totales (en tant que N) (%)	0.83
Lipides totaux (%)	1.98
Contenu de Vit C (mg/100 g)	0.185
Minéraux (mg/100 g)	
Sodium	13
Potassium	202.8
Fer	7.8
Magnésium	143
Calcium	338

I.3.6.3. Propriétés du sirop de datte

A. Propriétés organoleptiques du sirop

- **Goût**

L'intensité du goût sucre diffère considérablement d'un édulcorant à un autre, même au sein de la famille des glucides (**Kemassi, 2015**).

La plupart des édulcorants à haut pouvoir sucrant possèdent des arrière-goûts qui se superposent au goût sucre et résulte d'impuretés qui sont parfois indéfinissables au point de ne pas se ranger parmi les trois goûts fondamentaux (sale, acide, ou amer) (**Multon et De Reynal, 1984**).

Le sirop de dattes est caractérisé par le goût sucré pur, grâce à la teneur de solides solubles élevée, par rapport à la matière première utilisée pour son élaboration. Le goût du sirop est similaire au goût de la datte utilisée (**Messaoudi et Bekkari, 2016**).

- **Couleur**

Le sirop de dattes est un produit stable d'une couleur plus ou moins brune. Dans des flacons transparents, il peut prendre une couleur noir rougeâtre.

B. Propriétés physiques du sirop

- **Densité**

La densité moyenne d'un sirop est en fonction de leur concentration. Cette dernière est inversement proportionnelle à la température ambiante. La densité de sirop de dattes est très élevée grâce au taux de solides solubles existant dans ce produit, ce caractère permet leur stockage pendant une longue durée.

- **Viscosité**

Le sirop de dattes est un produit très visqueux, ceci est dû à la faible humidité. Cette propriété est importante pour préserver la qualité du produit durant deux ans et empêche la prolifération des microorganismes (**Ferhat Hamida et Laklouka, 2015**).

C. Aspects bactériologiques

Le développement des microorganismes est lié à l'activité de l'eau et au couple pH/température de milieu (**Multon, 1992**).

I.3.6.4. Utilisations de sirop da datte

Le sirop de dattes est fréquemment utilisé dans les biscuits et les produits laitiers (boissons, yaourts, desserts, etc), produits à base de céréales (barres et petit-déjeuner), confiserie, préparation de fruits, glaces, boulangerie, snacks, substituts du saccharose et du miel pour les consommateurs...etc

Ce produit, bien qu'il possède un aspect sombre et stable, il est utilisé comme édulcorant dans de nombreuses préparations pâtisseries et peut également servir comme matière de base dans la production de boissons gazeuses (**Ferhat Hamida et Laklouka, 2015**).

Grâce à leur valeur nutritive et leur teneur en composition biochimique, plusieurs chercheurs (**Bacha, 2008; Ben Abbes, 2011; Djoudi, 2013; Kemassi, 2015; Retima, 2015; Zoubiri, 2012**) sont utilisés le sirop de datte comme milieu de base pour la culture des microorganismes.

Le milieu est ensuite supplémenté par différentes sources d'azote (extrait de levure, urée, sulfate d'ammonium et peptone), de vitamines (biotine et thiamine) et des sels minéraux (**Bedaïda, 2014**).

Partie II
Matériel et méthodes

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Isolement et sélection des souches levuriennes amylolytique

II.1.1. Echantillonnage

Notre travail est basé sur la production et la caractérisation d'une α -amylase sécrétée par des levures isolées à partir du sol saharien algérien. En effet, les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés au niveau de cité Sidi Mastour El-Oued.

Après l'écartement de la couche superficielle, environ 100 g de sol sont prélevés et introduits dans un sachet en plastique stérile, puis transportés au laboratoire dans les conditions d'asepsies rigoureuses afin d'être analysés (Merabti, 2006).

II.1.2. Détermination des paramètres physicochimiques et biochimiques du sol

Les analyses physicochimiques et biochimiques du sol ont été réalisées au niveau de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (I.N.R.A.A.) sidi Mehdi Touggourt, Ouargla.

II.1.2.1. Mesure du pH

Selon la méthode de Davet et Rouxel (1997), la détermination de valeur du pH d'une suspension du sol contenant 10 g du sol dans 90 ml d'eau distillée se fait à l'aide d'un pH mètre (PHM210. Meterlab) (Boucherit, 2011).

II.1.2.2. Humidité

L'humidité de la terre est déterminée sur un échantillon fraîchement prélevé par différence entre le poids de l'échantillon humide et le poids de l'échantillon séché à 105 °C (Multon, 1982).

L'humidité est mesurée par la formule:

$$\text{Humidité (\%)} = [(P1 - P2)/P3]100$$

- **P1:** Poids d'échantillon humide contenu dans un bocal fermé;
- **P2:** Poids de l'échantillon séché contenu dans un bocal fermé;
- **P3:** Poids de la prise d'essai.

II.1.2.3. Mesure de la conductivité électrique du sol

Selon la méthode de **Mathieu et Pielain (2009)**, 10 g de sol sont mélangés avec 50 ml d'eau distillée. Après agitation de 30 min, la décantation est accélérée par centrifugation pendant 2 min. La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (**Boukhelkhal, 2013**).

II.1.2.4. Mesure de la matière organique

L'échantillon est calciné à 480 °C dans un four à moufle pendant 5 heures. La perte de masse par combustion correspond à la quantité de la matière organique (**Boucherit, 2011**).

II.1.3. Isolement des levures

L'isolement des levures prélevées est réalisé sur milieu gélosé Sabouraud (**Acharya et al., 2014**). Une solution mère est préparée avec 1 g de sol dans 10 ml d'eau physiologique stérile (**Ulacio et al., 1997**). Une série de dilutions décimales sont préparées jusqu'à 10^{-3} , chaque dilution subit une homogénéisation par agitation (**Boulal et al., 2017**). L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1 ml de suspension de sol en stries transversales. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C, pendant 3 à 5 jours (Figure 06) (**Hammer et al., 1998**).

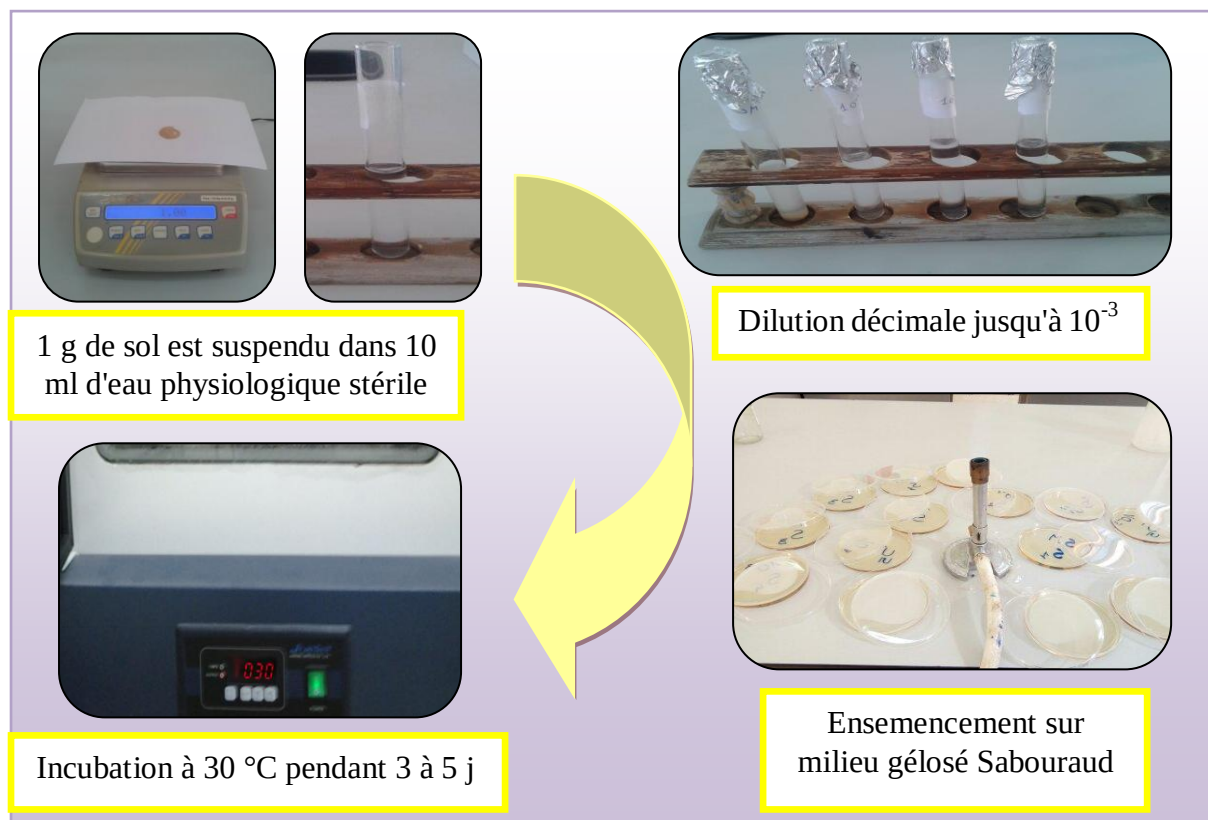


Figure 06: Technique d'isolement des souches levuriennes.

II.1.4. Purification

Les levures développées sont repiquées sur le même milieu (Sabouraud) dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention des souches pures. Les colonies bien isolées, ont subi une observation macroscopique (couleur, forme, odeur), suivie d'une coloration au bleu de méthylène et observation microscopique à l'objectif X40, pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules (**Bensmail, 2012**).

II.1.5. Conservation

Les jeunes colonies levuriennes sont aseptiquement transférées et ensemencées sur gélose inclinée pendant 3 à 5 j pour permettre une croissance maximale (**Lagzouli et al., 2017**). Les cultures pures sont alors stockées à 4 °C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**Haq et al., 2002**).

II.1.6. Sélection des souches amylolytiques

Selon la méthode décrite par **Tatsinkou et ses collaborateurs (2005)**, les souches amylolytiques sont sélectionnées sur milieu PDA à 4 % d'amidon (Annexe 1). L'incubation a lieu à 30 °C pendant 5 j. Après incubation, une solution de lugol est versée à la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amylasique (**Acharya et al., 2014**). Les souches, à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d' α - amylase.

II.2. Identification

L'identification est effectuée sur les souches de levures précédemment isolées et considérées à activité amylolytique performante. Elle comprend l'identification phénotypique des souches levuriennes sélectionnées (**Barnett, 2000; Kreger-Van, 1984; Lodder, 1971**). Ces souches sont repiquées à partir de culture pure, conservée à 4 °C sur milieu solide Sabouraud et incubée à 30 °C pendant 03 à 05 j.

L'identification phénotypique des isolats est basée sur les critères morphologiques (microscopiques), culturels (macroscopiques) et biochimiques.

II.2.1. Etude des caractères morphologiques cellulaires

II.2.1.1. Etude de caractères macroscopiques

Les cultures sont identifiées sur milieu gélosé (Sabouraud), à 30 °C pendant une durée d'incubation de 3 à 5 j. L'examen à l'œil nu permet la détermination des caractères suivants:

- La couleur;
- La forme des colonies (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves);
- la texture;
- L'aspect des cultures (brillant ou mat).

II.2.1.2. Etude de caractères microscopiques

Ces caractères sont étudiés d'après des préparations microscopiques (objectif X40 puis X100), effectuées entre lame et lamelle à l'état frais et en utilisant un colorant (le bleu de méthylène) (Annexe 2).

- **Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative:** l'observation microscopique permet de définir la forme, la taille, l'arrangement et le mode de division des cellules;
- **Test de filamentation:** L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique (objectifs X40 puis X100). Pour cela, le milieu PDA est déposé à la pipette sur une lame préalablement stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner estensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri contenant un peu d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique se fait après 3 à 5 j. La bordure de la culture est examinée, si la levure filamenteuse, la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées (**Bacha, 2008; Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

II.2.2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques effectuées, sont la fermentation des sucres et l'assimilation des composés azotés (Annexe 2).

II.2.2.1. Fermentation des sucres

Les tests de fermentation sont effectués avec des sucres très purs à des concentrations de 30 %. Les sucres testés sont: le D-glucose, le maltose, le D-fructose, le saccharose et le D-galactose, le 6^{ème} sert de tube témoin. La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres, est le milieu eau de levure (Annexe 1), le milieu est réparti en tubes à essai, à raison de 9 ml par tube. Les tubes sontensemencés avec 3 gouttes d'une suspension de levure. Ajouter à la surface de chaque tube quelques gouttes de paraffine molle fondue et stérile qui, en se refroidissant, former un bouchon. Les cultures sont incubées à 25 à 28 °C, pendant 48 h à 3

semaines. Le test d'un résultat positif se manifeste le soulèvement plus ou moins du bouchon de paraffine, suivant le pouvoir fermentaire de la souche étudiée (**Wickerham et Burton, 1948; Wickerham, 1951**).

II.2.2.2. Assimilation des composés azotés

L'assimilation des composés azotés s'étudie par la méthode de l'auxanogramme. L'assimilation des nitrates comme seule source d'azote est un critère taxonomique très important, beaucoup de microorganismes ne peuvent pas l'assimiler (**Barnett et al., 2000**).

La source d'azote testée est le nitrate de potassium. Un témoin, est effectué avec du sulfate d'ammonium.

Une suspension de 1 ml de la levure à tester est introduite en masse dans une boîte de pétri avec le milieu de base YCB (annexe 1) (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

Lorsque le milieu a pris en masse, les sources d'azote sont déposées à la surface. Après 3 j d'incubation à 28 °C, on observe la croissance de la levure autour du composé azoté.

II.3. Production de l' α -amylase

Dans cette partie, seules les souches répondant positivement au test amylolytique sont retenues pour la suite de travail. Elles seront cultivées dans un milieu à base du sirop de datte en vue du:

- ✓ Etude de la cinétique de production d' α -amylase en suivant l'évolution de la biomasse et de l'activité α -amylasique des souches étudiées pendant 05 j d'incubation à 30 °C;
- ✓ Purification d' α -amylase et étude de quelques propriétés physicochimiques d'enzyme purifié.

II.3.1. Milieu de base

Le sirop de datte a été élaboré selon la méthode décrite par **Al-farsi et al. (2007)**, par l'utilisation de datte moelle de variété ghars. Une fois les dattes lavées, dénoyautées et broyées, on ajoute à 1 kg de dattes 2 litres d'eau distillé. On porte au bain-marie à 85 °C pendant 45 minutes et sous agitation continue. Une fois le jus extrait, on le filtre à travers un papier Wattman N° 4 et on le stérilise à 120 °C pendant 20 min (Figure 07).

Vu à la faible teneur de la datte en éléments nutritifs, essentiellement en protéines et en sels minéraux, le milieu a été enrichi avec les éléments nutritifs suivants:

- Ammoniaque (NH_4OH): 1 ml/l;
- Sulfate de magnésium (MgSO_4): 0.15 g/l;
- Sulfate de potassium monobasique (KH_2PO_4): 0.3 g/l (**Refice et al., 2011**).

Le pH est ajusté à 5.0 par une solution d'hydroxyde de sodium NaOH et on ajouté 4 g/l d'amidon comme inducteur (substrat enzymatique) (**Al-farsi, 2002**). Le milieu est conservé par réfrigération à 4 °C dans des flacons de verre fermés.



Figure 07: Etapes de préparation de sirop de datte.

II.3.2. Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte

Toutes les analyses physicochimiques et biochimiques du sirop de datte ont été réalisées au niveau de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (I.N.R.A.A.) sidi Mehdi Touggourt, Ouargla.

II.3.2.1. Détermination du pH

La détermination du pH du sirop de datte s'effectue par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné (**Benaouida, 2008**).

II.3.2.2. Détermination du taux de cendres

Les cendres sont déterminées par incinération. La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche (à 105 °C pendant 20 h) est suivie par une calcination au four à moufle à 550 °C pendant 5 h (**Zoubiri, 2012**).

Les cendres exprimées en pourcentage de masse sont données par la formule:

$$C (\%) = [(M1 - M2)/(M3 - M2)]100$$

- **M1:** Masse de la capsule et les cendres;
- **M2:** Masse de la capsule vide;
- **M3:** Masse de la capsule et la prise d'essai.

II.3.2.3. Détermination d'humidité

La teneur en eau est déterminée dans une étuve à 105 °C par dessiccation de 10 grammes de dattes ou de jus durant 18 h (**Amellal Née Chibane, 2008**).

II.3.2.4. Détermination de l'acidité titrable

On a utilisé la méthode colorimétrique décrite par la norme française (**NF V 05- 101 du janvier 1974**).

Le titrage de l'acidité se fait avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) de 0.1 N en présence de quelques gouttes de phénolphthaléine comme indicateur. La réaction est arrêtée dès l'apparition d'une couleur rose qui dure quelques minutes par rapport à un témoin.

L'acidité titrable est donnée par la formule:

$$A = V1/V0$$

- **V0**: le volume, en millilitre, de la prise d'essai;
- **V1**: le volume, en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée.

II.3.2.5. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de **Dubois et al. (1956)** dont le principe repose sur la réaction suivante: l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

II.3.2.6. Dosage des sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs est effectué par la méthode de **Bertrand**. Le principe de cette méthode repose sur la réduction de la liqueur de Fehling, mélange d'une solution de sulfate de cuivre et de sel de Seignette (tartrate double de potassium et de sodium) en présence de soude, par les sucres présents dans le sirop de datte. Son principe repose sur la réduction de l'oxyde cuivrique CuO en petits grains rouges-brique d'oxyde cuivreux Cu₂O (**Audigue et al., 1984 cité par Acourene et Tama, 2001**).

II.3.3. Préparation d'inoculum

Les souches de levure conservées au réfrigérateur à une température de 4 °C, sont repiquées, puis mise à incuber à 30 °C pendant 72 h. Une suspension des souches dans de l'eau physiologique est ensuite préparée (**Nouadri, 2011**).

II.3.4. Conduite de la fermentation

Les cultures sont réalisées dans des flacons en verre de 200 ml à raison de 50 ml du milieu de production par flacon. Après stérilisation à 120 °C pendant 20 min, l'ensemencement des milieux de culture est effectué avec 1 ml de suspension cellulaire. Les flacons ensemencés sont incubés à 30 °C pendant 5 j, les expérimentations sont réalisées en trois essais (**Merabti, 2006**).

II.3.5. Cinétique de production de l' α -amylase

Des prélèvements effectués régulièrement chaque 24 h, pour la détermination du:

- pH;
- Sucres totaux;
- Protéines,
- Biomasse produite;
- Activité amylasique pour les souches cultivées.

II.3.5.1. Mesure du pH

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (PHM210. Meterlab).

II.3.5.2. Dosage des sucres totaux

A 1 ml d'extrait enzymatique, on ajouté 10 ml d'eau distillé suivi par l'addition de 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Après l'agitation du tube, laisser refroidir à obscurité pendant 30 min à température ambiante (Annexe 3).

L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 490 nm. Le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 $\mu\text{g/ml}$ (Annexe 6) (**Dubois et al., 1956**).

II.3.5.3. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par la méthode de **Bradford (1976)**, où le bleu de coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 min, le Sérum Albumine Bovine (SAB) est utilisé comme standard (Annexe 6).

A 0.1 ml de l'extrait enzymatique, on ajoute 5 ml du bleu de coomassie. Le mélange est laissé à obscurité pendant 2 à 30 min à la température ambiante (Annexe 4).

II.3.5.4. Mesure de la biomasse

Le poids sec de la biomasse produite est déterminé chaque 24 h jusqu'à la fin des fermentations. Après centrifugation (3000 trs/min pendant 15 min) et rinçage de culot avec

l'eau distillée, la biomasse est séchée dans une étuve réglée à 105 °C jusqu'à poids constant (Mahnaaz et al., 2010; Sadiq et al., 2014).

II.3.5.5. Dosage de l'activité α -amylasique

L'activité α -amylasique est mesurée selon la méthode de **Bernfeld (1955)**, dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur lors de l'hydrolyse de l'amidon.

A 1 ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH 7 avec du tampon phosphate 0.1 M, on ajoute 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml HCl à 1 M suivie de 2,5 ml du réactif de l'iode. L'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc (préparé à partir de l'extrait enzymatique dénaturé à 100 °C) (**Saci., 2012**) (Annexe 5).

II.4. Purification partielle de l' α -amylase et étude de leurs propriétés physicochimique

Cette purification est effectuée dans le but de concentrer et de purifier l'extrait brut, pour permettre l'étude de quelques caractéristiques physicochimiques de l'enzyme.

II.4.1. Purification partielle de l' α -amylase

Selon les méthodes et les techniques utilisées par **Abouzeid (1997)**, **Chao-Hsun et ses collaborateurs (2004)**, **Damodara et al., (2005)** et **El Safey et Ammar (2004)**, l' α -amylase est purifiée en trois étapes:

- Précipitation au sulfate d'ammonium;
- Dialyse;
- Méthodes chromatographiques.

Dans ce travail, on a fait une purification partielle avec la première étape seulement (Annexe 7).

II.4.1.1. Préparation de l'extrait brut

Après 04 j d'incubation de souche à 30 °C dans le milieu de base, le milieu de culture obtenu subit une centrifugeuse à 5000 trs pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut (**El Safey et Ammar, 2004; Sidkey et al., 2011**).

On a fait le dosage des protéines et d'activité amylasique.

II.4.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

❖ Principe

L'addition de sulfate d'ammonium à une solution protéique aqueuse entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la stabilité des protéines, ce qui conduit à leur précipitation (**Osterlund et Janson, 1997**).

❖ Protocole de précipitation

L'extrait enzymatique brut est précipité avec le sulfate d'ammonium. L'échantillon est saturé, par un gradient variant de 30 % à 80 % (**Dixon et webb, 1964**). La précipitation est effectuée dans un bain de glace, sous agitation continue, afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme. Les protéines précipitées, sont récupérées par centrifugation pendant 15 min à 500 trs à 4 °C. Les fractions sont suspendues dans du tampon phosphate 0.2 M pH= 6 (**El Safey et Ammar, 2004**).

L'activité spécifique de l'enzyme est estimée dans toutes les fractions récoltées (**Desmazeau et Hermier, 1968**). Elle est donnée par la formule:

$$\text{L'activité spécifique} = \frac{\text{L'activité amylasique}}{\text{la concentration en protéines totales (mg/ml)}}$$

II.4.2. Etude de quelques propriétés physicochimiques de l' α -amylase partiellement purifiée

II.4.2.1. Effet du pH

Le pH optimal est estimé dans l'intervalle de 3 à 9 en utilisant les tampons suivant:

- Tampon acétate de sodium 0.2 M ou citrate-phosphate 0.1 M (3 à 5.5);
- Tampon phosphate de sodium 0.1 M (6 à 7.5);
- Tampon Tris-HCl 0.1 M (8 à 9).

L'activité enzymatique a été mesurée (**Arpana et al., 2013; Emenike, 2015**).

II.4.2.2. Effet de la température

L'effet de la température est étudié dans l'intervalle de 0 °C à 80 °C en mesurant l'activité enzymatique au pH optimal (**Arpana et al., 2013; Padmini et al., 2012**).

II.4.2.3. Effet de concentration d'enzyme

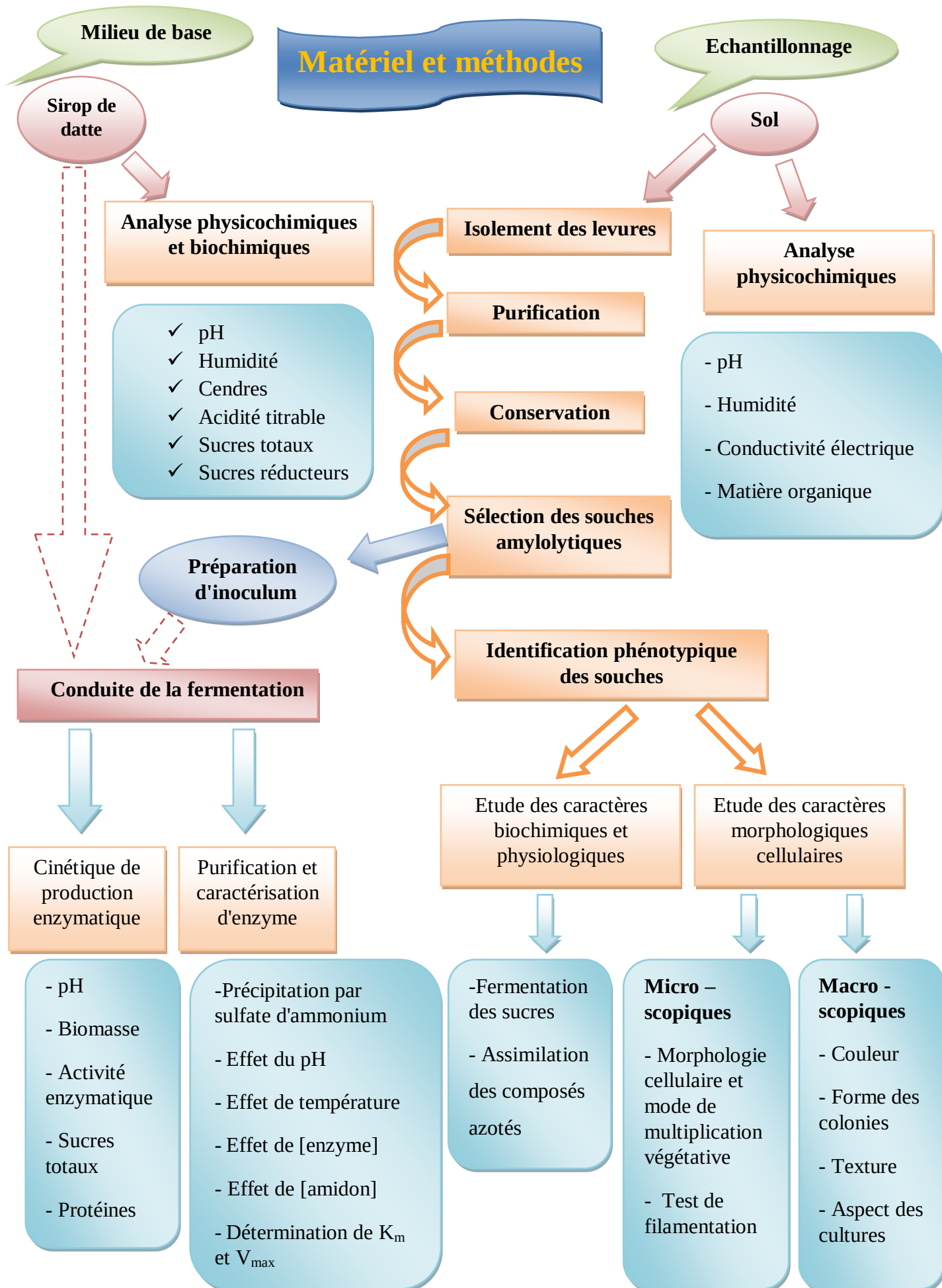
Une série des dilutions d'enzyme purifié ont été effectuées: 0.0012, 0.002, 0.005, 0.007, 0.01 et 0.012 (mg protéine/ml), l'activité enzymatique est mesurée aux valeurs de pH et température optimaux (El Safey et Ammar, 2004; Padmini et al., 2012).

II.4.2.4. Effet de concentration de substrat

L'enzyme purifié est incubé avec différentes concentrations de solution d'amidon (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 et 4.0 mg/ml). Les vitesses initiales sont déterminées dans les conditions habituelles par le dosage de l'activité enzymatique (El Gendy, 2012; El Safey et Ammar, 2004).

II.4.2.5. Détermination des constantes cinétique d'enzyme (K_m et V_{max})

Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l' α -amylase purifiée sont déterminés graphiquement par la représentation de **Lineweaver-Burk (1934)**. L'amidon soluble avec différentes concentrations (0.1 à 4.0 mg/ml) est utilisé comme substrat naturel de l'enzyme purifiée (Emenike, 2015; Sidkey et al., 2011).



Partie III
Résultats et Discussion

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la production de l' α -amylase levurienne à application variée dans les différents secteurs industriels. Nous allons présenter, dans un premier temps, les résultats de l'isolement et la sélection des levures amylolytiques provenant de sol prélevé au niveau de cité Sidi Mastour El-Oued et l'identification phénotypique de ces souches. Dans un deuxième temps, nous exposons les résultats de la production enzymatique et son étude cinétique. Aussi, nous montrons les résultats de la purification partielle d'enzyme étudiée et d'étude de leurs propriétés physicochimiques et paramètres cinétiques.

III.1. Isolement et sélection des souches levuriennes amylolytique

III.1.1. Analyses physicochimiques du sol

Les propriétés physicochimiques d'échantillon du sol sont rapportées dans le tableau 08. La zone d'où l'échantillon a été prélevé se considère comme un sol peu salé avec un taux de matière organique très réduit.

Tableau 08: Analyses physicochimiques du sol.

Paramètre Echantillon	pH	Cendre (%)	Humidité (%)	CE (mS/cm)
Sol	6.3	0.00033	14.6	1.03125

Selon **Richards (1969)**, on peut définir le type de sol en fonction de sa conductivité (tableau 09). La conductivité électrique (CE), facteur indiquant le degré de salinité du sol, est inférieure à 1.2, révélant une faible salinité des sols environnant la source étudiée.

Tableau 09: Types de sol en fonction de la conductivité électrique (Richards, 1969).

Type de sol	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
Conductivité (mS/cm)	< 0.6	0.6 - 1.2	1.2 - 2.4	2.4 - 6	> 6

Le tableau 08 montre que le pH d'échantillon est neutre tendant légèrement vers l'acidité (pH= 6.3) ce qui concorde avec les résultats obtenus par **Dendouga (2006)** au niveau de Sebkhia d'El-Mghair (pH= 6.89) et **Merabti (2006)** au niveau de la palmeraie de M'ghaiar (El-Oued) avec une valeur de pH= 6.78.

Alors que ces résultats se confrontent avec ceux obtenus par **Boucherit (2011)**, **Kherraz et Lobri (2015)** et **Massaoudi et Bekkari (2016)** qui ont trouvés une gamme de pH entre (7.71- 8.11).

Selon **Benmouaffeki (2011)** et **Hammia (2012)**, la réaction du sol (pH) est influencée par la nature de sels. Alors que certains sels sont acidifiant (CaSO_4 , KCl , MgSO_4) d'autres sont alcalinisant (NaHCO_3 , CaCO_3 , Na_2CO_3).

Les analyses ont montré que l'échantillon est presque nul en matière organique (0.00033 %) mais relativement riches en sel minéraux. Elles ont également montré un taux relativement élevé d'humidité de sol (14.6 %).

III.1.2. Isolement des souches levuriennes

L'isolement des levures, à partir d'échantillon de sol saharien (Sidi Mastour El-oued), a permis de répertorier cinq souches (S1, S2, S3, S4 et S5).

Le tableau 10 résume la répartition du nombre de colonies apparues dans les dilutions effectués.

Tableau 10: Isolement des souches de levures à partir d'échantillon de sol sur milieu gélosé "Sabouraud".

Echantillon	Région	Dilution	Nombre des souches	Code d'isolat
Sol	Sidi Mastour, El-Oued	SM	01	S1
		10^{-1}		
		10^{-2}	01	S3
		10^{-3}	03	S2, S4, S5

Le peuplement faible des sols étudiés (cinq souches levuriennes) est lié à une teneur insuffisante en matière organique (inférieure à 2 %) présente dans le site, comme décrit par **Gunde-Cimerman et al., (2005)**, qui ont mentionné que le nombre des levures halophiles du sol est proportionnel à sa quantité en matière organique, et également lié à la structure du sol, qui exerce un effet sur leur distribution (**Phaff et Starmer, 1987**).

Ce taux faible peut être aussi justifié par le pH du sol, relativement neutre (6.3) favorisant plutôt une reproduction rapide des populations bactériennes (Allen et Ahearn, 1987) aux dépens de celle des levures, dont la croissance est optimale à des pH acides (<6) (Larpent et Larpent-Gaurgaud, 1997; Phaff et al., 1978).

Malgré ces conditions extrêmes, quelques souches levuriennes arrivent à résister, ce qui explique le faible taux de souches obtenues. Cette survie, est probablement favorisée pour la forme sporulant, où il a été mis en évidence la capacité des levures capsulées (*Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) à survivre dans les habitats pauvres en aliments et pendant les périodes de dessiccation (Golubev et al., 1984).

III.1.3. Sélection des souches amylolytiques

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les cinq isolats, nous avons utilisé un milieu PDA à 4 % d'amidon (milieu sélectif). Après l'incubation à 30 °C pendant 48 h, nous observons des zones de lyse de différentes dimensions. Les souches S2, S3 et S5 ont développé des zones de lyse (halo clair) sur ce milieu sélectif, cependant S1 et S4 n'en possèdent pas (figure 08).

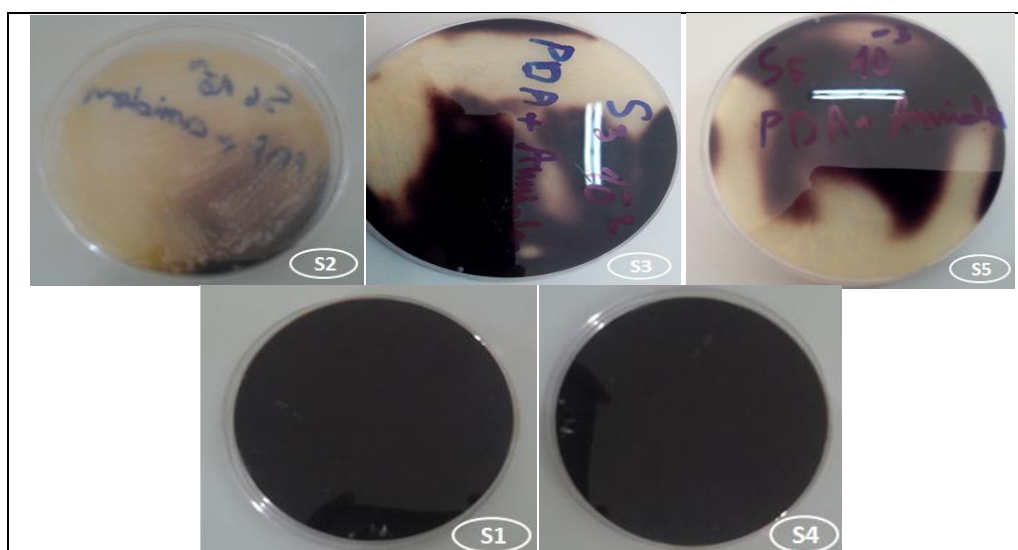


Figure 08: Sélection de souches amylolytiques sur PDA à 4 % d'amidon (après 48 h d'incubation à 30 °C et à pH 5).

D'après les résultats d'analyse physicochimique de sol, la zone d'étude est considérée comme un milieu extrême avec un pH relativement neutre et un teneur presque nul en matière organique. A cause de ces conditions, le sol étudié présente un peuplement faible des levures présenté par les souches résistantes grâce à leurs formes sporulant.

Par leur forte capacité à hydrolyser l'amidon, trois souches seulement (S2, S3 et S5), seront sélectionnées pour la suite de travail.

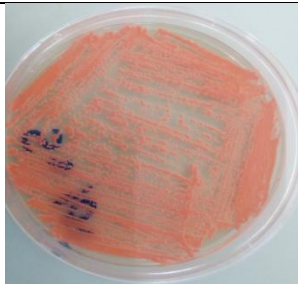
III.2. Identification

L'identification des souches précédemment sélectionnées est basée sur les clefs de détermination de **(Barnett, 2000; Kreger-Van, 1984; Lodder, 1971)**. Ces souches sont identifiées après une étude morphologique (microscopique), culturale (macroscopique) et biochimique.

III.2.1. Etude de caractères macroscopiques

Après incubation pendant trois jours à 30 °C, les colonies isolées ont subi une observation macroscopique. Les caractéristiques principales des colonies sont récapitulées dans le tableau 11.

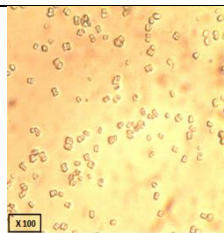
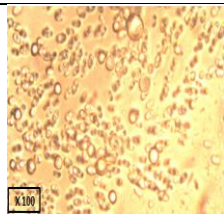
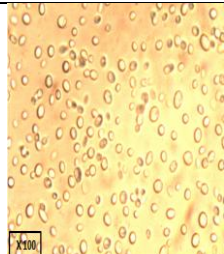
Tableau 11: Caractères macroscopiques des trois souches de levures sélectionnées.

Code	Caractéristiques macroscopiques			Observation macroscopique
	Couleur	Forme et texture	Aspect	
S2	Blanche	Colonies plates, rondes, Contour entier (régulier), crèmeuses	Lisses, brillantes	
S3	Orange	Contour entier (régulier), crémeuse, bombé, rondes	Lisses, brillantes	
S5	Blanche	Contour entier (régulier), crémeuse, bombé, rondes	Lisses, brillantes	

III.2.2. Etude de caractères microscopiques

L'étude macroscopique réalisée préalablement est accompagnée par une étude microscopique (X100) dans le but de déterminer les espèces des souches sélectionnées. Les résultats d'observation sont rassemblés dans le tableau 12.

Tableau 12: Caractères microscopiques (X100) des souches sélectionnées.

Code	Caractéristiques microscopiques				Observation microscopique
	Forme des cellules	Mode de reproduction	Filamentation	Mobilité	
S2	Rondes à ovalaires de petite taille	Bourgeonnement mono, bi et multilatéral	Pas de filaments	Mobile	
S3	Ovoïdes à sphériques	Bourgeonnement multilatéral et scissiparité	Pas de filaments	Immobile	
S5	Ovoïdes et sphériques	Reproduction végétative par bourgeonnement mono, bi et multilatéral	Pas de filaments	Mobile	

III.2.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Les composés carbonés et azotés sont les substrats le plus fréquemment utilisés par les levures. Certaines levures ont la capacité d'utiliser une large gamme de ces composés, contrairement à d'autres qui en assimilent moins. Vue à l'importance de ces critères dans la physiologie des levures, nous avons les utilisés pour l'identification des trois souches sélectionnées. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Comme prévu toutes les espèces de levures ont consommé de façon très active le glucose et le galactose comme sources de carbone. Ces sucres simples représentent les formes préférentielles de transport à l'intérieur de la cellule (Botton, 1991).

Tableau 13: Caractères biochimiques et physiologiques des souches sélectionnées.

Code	Fermentation des sucres					Assimilation des composés azotés		Espèce
	Glu	Fru	Mal	Gal	Sach	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	
S2	+	+	-	+	-	-	-	<i>Candida glabrata</i>
S3	+	+	-	+	-	+	+	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
S5	+	+	-	+	+	+	-	<i>Candida lusitaniae</i>

Fermentation négative (-) fermentation positive (+)

Les testes de fermentescibilité des sucres recherche à identifier les différentes souches. Les résultats du tableau 13, révèlent que les différents sucres testés dont le glucose, le fructose et le galactose, seul le maltose est non fermentescible par les trois souches. Il apparaît que les souches de levure étudiées (S2 et S3) peuvent fermenter trois sucres dont (le glucose, le fructose et le galactose), alors que la souche S5 peut fermenter aussi le saccharose.

Selon les caractéristiques morphologiques et physiologiques de levures données par **Dufresne et Guy (2014)**, et selon les clefs de détermination de **Lodder (1971)** et de **Kreger Van (1984)**, les souches en présence semblent être *Candida glabrata* pour S2, *Rhodotorula mucilaginosa* pour S3 et *Candida lusitaniae* pour S5. De même, cette affirmation se confirme par le test d'assimilation de nitrate comme seul source d'azote.

De plus, le métabolisme fermentaire observé (en particulier la fermentation des sucres et l'assimilation des nitrates) et le processus de multiplication végétative, correspondent bien à ceux cités par **Dakhmouche-Djekrif (2016)** et **Dufresne et Guy (2014)** pour ces genres de levure.

De nombreuses études dont **Felipe et ses collaborateurs (2008)**, **Hamad (2009)**, **Lagane (2007)**, **Pierquin (2010)** et **Thierry (2015)**, montrent que ces genres sont plus répandus au niveau de sol et autres sources tell que l'air, l'eau, les plantes et les aliments.

Alors que **Dakhmouche-Djekrif (2016)** a réalisé l'isolement de ces espèces à partir de grains de blé dur stockés dans des régions aride et semi-aride.

Selon les résultats obtenus au cours du processus d'identification, on peut conclure que parmi les trois souches isolées et sélectionnées, une souche appartient à l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa*, une à *Candida glabrata* et une à *Candida lusitaniae*.

III.3. Production de l' α -amylase

III.3.1. Analyses physicochimiques et biochimiques de sirop de datte

Les caractéristiques physicochimiques du sirop de datte utilisé comme milieu de base pour la production enzymatique sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14: Les caractéristiques physicochimiques et biochimiques du sirop de datte de variété Ghars.

Paramètre	Valeur
pH	4.77
Acidité (g/l)	6.7
Humidité (%)	77.99
Cendre (%)	0.923
Sucres totaux (%)	25.17
Sucres réducteurs (%)	19.43

Le pH de l'extrait de datte est légèrement acide, il est de 4.77. Cette valeur est légèrement inférieure à celle donnée par **Benchabane (2012)** et **Daas Amiour (2009)**, avec des valeurs de 5.8 et de 5.02 respectivement, alors qu'elle est peu supérieure à celle obtenus par **Benagga et Gougui (2014)** et **Mimouni et Siboukeur (2011)** qui ont donné 3.98 et 4.33 respectivement. Ce pH est défavorable à la prolifération des bactéries à l'exception des acidophiles, mais il est favorable à la prolifération des levures et des moisissures (**Sayah et Ould elhadj, 2010**).

En outre, **Benchelah et Maka (2006)** et **Bourgeois (2003)**, signalent que les vitamines du groupe B contenues en quantités appréciables dans la datte se conservent bien aux pH compris entre 5 et 6, ce qui semble important pour les levures, dont certaines vitamines de ce groupe restent l'un de leurs facteurs de croissance (**Botton et al., 1990; Rivière, 1975**).

L'acidité titrable renseigne sur l'état physique du fruit ainsi que le pH. Notons qu'une forte acidité est souvent associée à une mauvaise qualité des dattes. En effet, il a été rapporté par **Booij et al. (1992)**, que le taux d'acidité de la datte est proportionnel à la teneur en eau et donc inversement proportionnel au degré de maturité.

Dans la présente étude, le sirop de datte ayant fait l'objet d'analyse présente une humidité d'ordre de 77.99 % avec une acidité titrable de 6.7 g/l. Ladite valeur d'acidité observée est comparable à celle trouvée par **Benagga et Gougui (2014)** et **Benahmed djilali (2012)** qui ont été évaluées, respectivement, à 5.5 et 2.24 g/l. Toutefois, nos résultats restent largement inférieurs à celle rapporté par **Bendjelloul et Berraghda (2014)**, qui ont trouvé un teneur s'étendant de 14.33 à 15.85 g/l.

Par définition, le taux de cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans un échantillon. Un faible teneur montre qu'il y a diffusion d'une grande quantité de minéraux, des dattes vers leurs sirops (**Mimouni et Siboukeur, 2014**). Plusieurs auteurs dont **Favier et al. (1993)**, **Fethi et El Kohtani (1979)**, **Lambiote (1983)** et **Maatallah (1970)** affirment que la datte est un fruit qui renferme, en général, des teneurs en cendres de l'ordre de 2 %.

La valeur trouvée chez le sirop de dattes étudiée est de 0.923 %. Ce résultat est concordant avec ceux trouvés par **Massaoudi et Bekkari (2016)** et **Siboukeur et al. (2001)** qui rapportent les valeurs de 1,4 et de 1.33 % respectivement. Toutefois, **Boudraa (2004)** signale un teneur de 1,74 % pour la variété Ghars. La teneur en cendres est dépendante aux conditions de fertilité du sol, aussi d'état d'irrigation des palmiers (**Baangood et al., 1984**).

La teneur en sucres totaux dans le sirop de datte est égale à 25.17 %, alors que celle des sucres réducteurs est de 19.43 %. Ces résultats sont comparables à celle trouvé par **Ferhat Hamida et Laklouka (2015)** où les sucres totaux sont de 30,53 % et les sucres réducteurs sont de 19,17 %. Malgré nos valeurs sont nettement inférieures à celles données par **Benchabane (2012)** et **Bendjelloul et Berraghda (2014)** qui sont obtenus, respectivement, les valeurs suivants: 79.36 et 73.42 % pour les sucres totaux et 36.9 et 26.44 % pour les sucres réducteurs, elles restent supérieur à celui rapporté par **Siboukeur (1997)** avec valeur 16.64 % pour les sucres totaux, et celui donné par **Benahmed (2012)** avec valeur 15.09 % pour les sucres réducteurs.

De nombreux auteurs, dont **Munier (1973)**, **Nixon et al. (1978)** et **Sawaya et al. (1983)**, s'accordent sur le fait que les sucres de dattes varient en fonction de la variété considérée, du climat et du stade de maturation. Les résultats rapportés par différents auteurs dépendent en partie de la méthode utilisée.

Le sirop de datte apparait acide et riche en sucres (tableau 14), il constitue donc un milieu favorable au développement des levures.

Cependant il est pauvre en certains autres éléments indispensables à leur développement tels que la matière azotée, ce qui confirme qu'il est nécessaire de l'enrichir par une source d'azote indispensable, aussi bien pour le bon développement des levures que pour la production d' α -amylase.

La teneur en cendres nous renseigne sur la quantité d'éléments minéraux dans le sirop de dattes. Bien que le pourcentage des cendres de ce sirop apparaisse faible (0.923 %), seule une source de phosphore sous forme de KH_2PO_4 a été additionnée, car selon la littérature, les dattes sont riches par certains minéraux tels que (Ca^{2+} et Mg^{+}), particulièrement abondants, mais restent pauvres en certains d'autres éléments tels que le phosphore qui est un élément indispensable pour la synthèse et le développement des acides nucléiques des microorganismes (**Benchelah et Maka, 2006; Jaccard, 2008**).

III.3.2. Cinétique de la production d' α -amylase

Dans cette partie, la cinétique de production d' α -amylase par les trois souches sélectionnées a été étudiée par l'évaluation des paramètres du milieu pendant la période d'incubation.

III.3.2.1. Evolution du pH

Le pH du milieu de production de l'enzyme est initialement ajusté à 5. La figure 09 montre l'évolution du pH de milieu en fonction de la durée d'incubation pendant cinq jours.

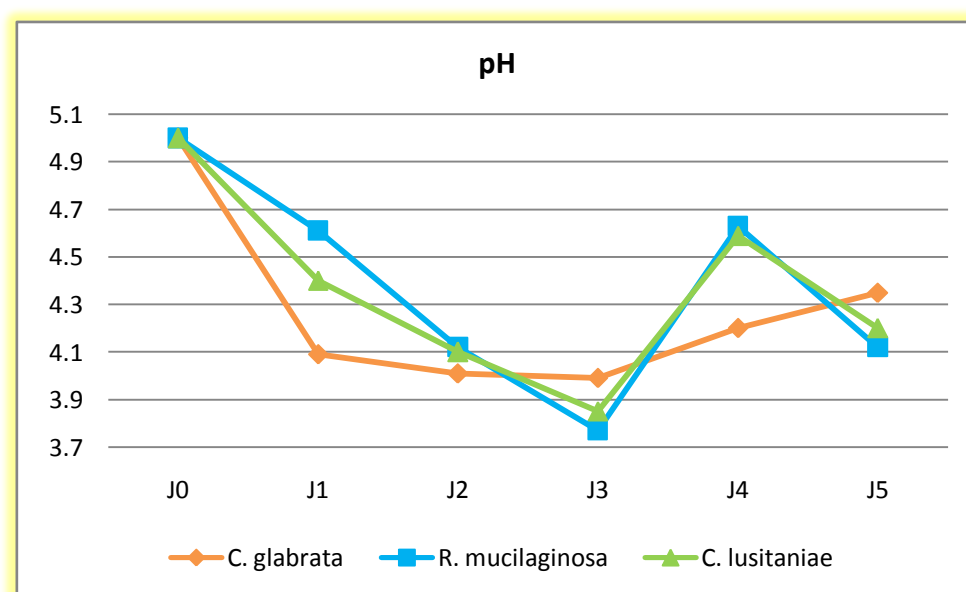


Figure 09: Variation du pH de milieu au cours de la culture.

Au cours de la fermentation, le pH diminue de manière progressive pour les trois souches pendant les premières 03 jours. Il passe de pH 5 à pH 3.99 pour *C. glabrata*, pH 3.77 pour *R. mucilaginosa* et pH 3.85 pour *C. lusitaniae*. Cette baisse est suivie d'une légère augmentation, qui ne dépasse pas le pH initial, au-delà de 3^{ème} j pour toutes les souches.

Cette expérience présente une gamme de pH varié de 3.77 à 4.63, ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Kemassi (2015)**, **Massaoudi et Bekkari (2016)** et **Zoubiri (2012)** qui sont trouvés respectivement un pH varié entre 3.57 à 4.5; 3.81 à 5.04 et 3.5 à 5.

La variation de pH de milieu au cours de la fermentation est due au changement de la composition du milieu et aux souches utilisées.

La diminution de pH est due probablement à la fermentations des sources carbonées disponibles dans le milieu, suite à la formation des acides organiques (acides succinique, acétique, formique, propionique, valérique etc...) (**Gancedo et Senano, 1989**), qui augmentent l'acidité du milieu (**Panchal, 1990; Refice et al., 2011**).

D'ailleurs, **Saito et al. (2003)** et **Soccol et al. (1994)** ont enregistré une chute de pH de 5 à 3,8 suite aux fermentations réalisées par *Rhizopus oryzae* ATCC 34612, qui synthétise l'acide fumarique et l'acide lactique qui s'accumulent dans le milieu.

Mais l'augmentation de pH est due certainement à la dégradation des protéines qui libèrent progressivement des acides aminés hydrolysés ensuite en ammoniacque par désamination (**Leclerc et al., 1995**). L'augmentation du pH s'explique également par la métabolisation des glucides qui libère du CO₂ que se transforme en acide carbonique (**Kemassi, 2015**).

A la fin de la fermentation, la diminution de la synthèse des acides organiques dans le milieu et la lyse cellulaire, provoquent aussi une augmentation de pH (**Bouix et Leveau, 1999**).

Toutefois, les variations du pH, peuvent influencer la croissance fongique, soit indirectement en agissant sur la disponibilité de certains nutriments, soit directement par action sur la membrane cellulaire, sachant que la plupart des souches fongiques peuvent ajuster le pH du milieu à leur convenance (**Boiron, 1996**). Par ailleurs, **Kelly (1985)** et **Prieto (1995)**, rapportent pour l' α -amylase, un pH optimum acide (4 à 4.5) pour *Lipomyces starkeyi* et (4.5 à 5.0) pour *Lipomyces kononenkoae* respectivement.

III.3.2.2. Evolution de la concentration des glucides

La figure 10 illustre l'évolution de la concentration des glucides durant l'incubation.

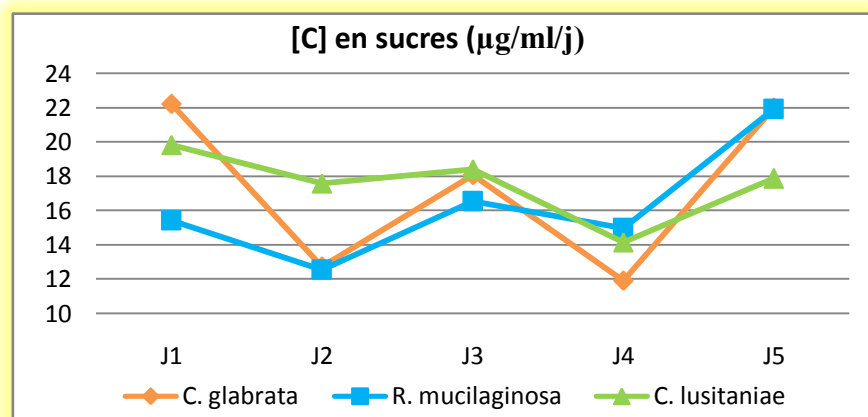


Figure 10: Variation de la concentration des glucides au cours de la culture.

Au cours de la fermentation, la teneur du milieu en sucres diminue pendant la phase de latence (jusqu'à 2^{ème} jours). Ceci peut être expliqué par le fait qu'au début de fermentation, les souches utilisent les nutriments facilement assimilables, tels que les sucres fermentescibles du sirop de dattes pour leur croissance (**Leveau et Bouix, 1993**).

Après cette phase, la concentration des glucides augmentent progressivement pour atteindre une valeur maximale de 22 µg/ml/j après cinq jours de fermentation. Cependant, au-delà des premiers jours et avec l'épuisement des sucres fermentescibles, les souches sécrètent des enzymes extracellulaires, telles que l' α -amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie (**Zoubiri., 2012**).

On note globalement une similitude entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la concentration des glucides, ce qui laisse suggérer que l' α -amylase est produite aux dépens de la présence de l'amidon et des oligosaccharides dans le milieu.

La forte production de l' α -amylase, observée en présence de l'amidon, suggère que l' α -amylase est une enzyme fortement induite par son substrat (**Bakri, 2003**). **Nouadri (2011)** pense qu'elle serait encore plus élevée sans la présence du glucose car il exerce un effet répresseur. Ceci est confirmé par la diminution de production d' α -amylase aux premiers jours d'incubation à cause de la présence de glucose dans le milieu de fermentation.

Ces résultats sont en accord aussi avec ceux observés dans l'étude de la production de l' α -amylase des moisissures *Trichoderma reesei* (**Momein et al., 2003**) et *Aspergillus oryzae* (**Raviyan et al., 2003**).

Le même phénomène de répression catabolique a été observé chez les bactéries *Clostridium thermohydro sulfuricum* (Hyun et al., 1985) et *Bacillus sp.* (Hagihara et al., 2001).

III.3.2.3. Evolution de la concentration des protéines

La figure 11 illustre l'évolution de la concentration des protéines durant l'incubation.

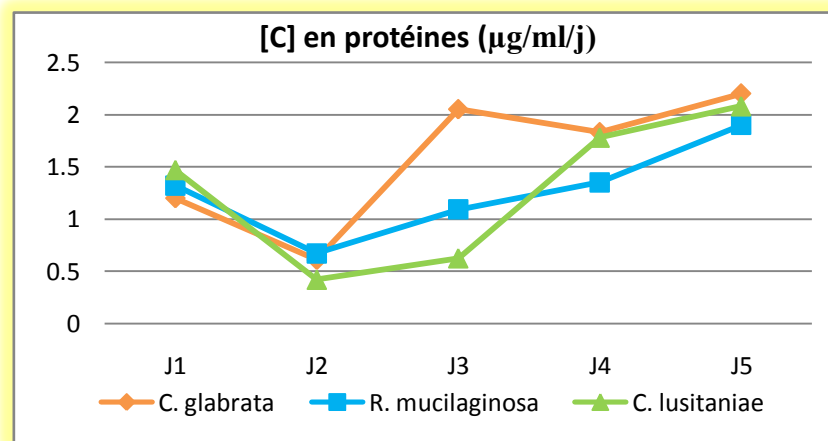


Figure 11: Variation de la concentration des protéines au cours de la culture.

La concentration en protéines varie modérément au cours de la fermentation. Une diminution est observée dans le milieu pour les trois souches, qu'on attient des valeurs minimales (0.42 ± 0.09 µg/ml/j) au 2^{ème} jour.

Par ailleurs, le taux de protéines est augmenté pendant la phase exponentielle de la fermentation (à partir de 2^{ème} jour). On observe une variation de 0.42 à 2.2 µg/ml/j, cette augmentation est expliquée par la synthèse des enzymes et en particulier α -amylase (Arnaud et Guiraud, 1999). Cette progression est en parfaite synergie avec les cinétiques de croissance et d'activité amylasique des trois souches.

On note globalement une similitude entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la concentration des protéines, ce qui laisse suggérer que la diminution de taux des protéines pendant les premiers jours de fermentation est le résultat de la faible production d' α -amylase (nature protéique) dans cette phase.

III.3.2.4. Evolution de la biomasse

La figure 12 représente la variation de la biomasse en fonction du temps d'incubation où les trois souches *C. glabrata*, *R. mucilaginosa* et *C. lusitaniae* montrent une cinétique de croissance microbienne durant les cinq jours de culture.

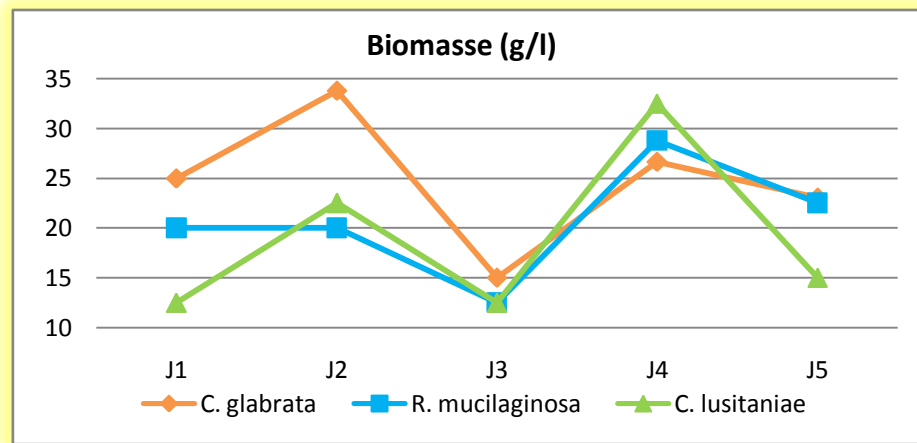


Figure 12: Variation de la biomasse au cours de la culture.

Ces résultats montrent que la croissance des souches débute dès les premières heures d'incubation. Cette croissance est due certainement à la richesse du sirop de dattes en nutriments indispensables au développement des levures. Ceci est en accord avec **Halwyn et al. (2002)** et **Malloch (1997)** qui signalent que toute substance organique peut constituer un substrat de croissance idéal pour les levures, car elles n'ont besoin que de trois éléments principaux pour développer: éléments nutritifs nécessaires, eau en quantité suffisante et une température appropriée.

La diminution de la croissance observée à partir de 2^{ème} jour correspond à l'épuisement des nutriments facilement assimilables continus dans le milieu de fermentation, ce qui déclenche une période d'adaptation des souches à son nouvel environnement et la synthèse des enzymes indispensables pour métaboliser les substrats composés présents dans le milieu. Au cours de cette phase, il n'y a pas de production cellulaire (**Bensamira, 2006**).

L'augmentation rapide de la quantité de biomasse dès le 3^{ème} j d'incubation, pour atteindre des valeurs maximales peut être expliquée par la phase exponentielle, qui est caractérisée par une accélération de croissance (**Zoubiri, 2012**).

La diminution de la quantité de biomasse est due à la phase de décélération qui se termine par une phase de déclin caractérisée par la présence dans le milieu, de substances ou déchets sécrétés par ces levures, inhibant la croissance progressivement jusqu'à l'arrêt.

L'accumulation de ces substances d'excrétions, provoque une autodestruction des cellules microbiennes; ce qui explique la diminution de leur quantité (**Arnaud et Guiraud, 1999; Leclerc et al., 1995; Leveau et Bouix, 1993**).

III.3.2.5. Evolution de l'activité amylasique

La cinétique de production d' α -amylase par les trois souches est représentée dans la figure 13.

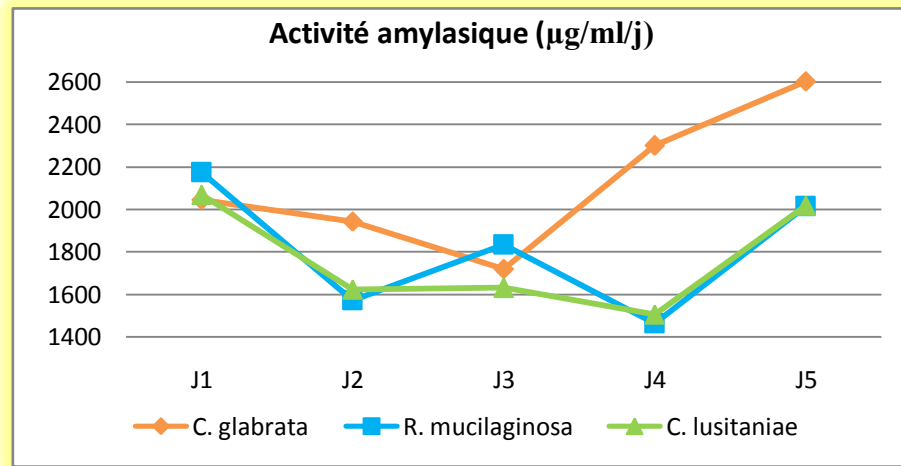


Figure 13: Variation de l'activité amylasique au cours de la culture.

L'enzyme apparaît dès le début de la fermentation (activité amylasique de 2175 ± 52.42 $\mu\text{g/ml/j}$) c'est-à-dire après 24 h d'incubation. Après cette phase, l'activité augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale de 2600 ± 2.9 $\mu\text{g/ml/j}$ après cinq jours de fermentation à 30 °C. Ce type de profil, a été rapporté par **Tatsinkou et ses collaborateurs (2005)** et par **Kocher et Katyal (2003)**, pour des levures ascomycètes cultivées respectivement, sur des milieux à base de blé et de pomme de terre.

Une diminution de l'activité enzymatique (1570.65 ± 50 $\mu\text{g/ml/j}$) est enregistrée au 2^{èmes} et 3^{èmes} jours d'incubation. Cette baisse est due au changement des conditions de la fermentation (**Chang et al., 1995**), ceci qui peut causer une inactivation d' α -amylase, due à l'interaction avec d'autres métabolites (enzymes, telles que les protéases ou substances toxiques) sécrétés dans le milieu, ou aux changements de pH affectant négativement le rendement en α -amylase (**Haq et al., 2002; Leclerc et al., 1995; Nahar et al., 2008 et Ramachandran et al., 2004**).

Aussi, la diminution peut être expliquée par le fait qu'au début de fermentation, les souches utilisent les nutriments facilement assimilables, tels que les sucres fermentescibles du sirop de dattes pour leur croissance (**Leveau et Bouix, 1993**).

L'augmentation de l'activité après le 3^{ème} jour d'incubation peut être expliquée par l'épuisement des sucres fermentescibles du milieu de fermentation, ce qui permet aux souches

de sécréter des enzymes extracellulaires, telles que l' α -amylase leur permettant de dégrader l'amidon pour garantir leur survie (**Zoubiri, 2012**). Elle peut être aussi expliquée par le fait que, ces levures sont en phase exponentielle de croissance (**Ramachandran et al., 2004**).

L'activité amylasique durant cette expérience varie de 1463.04 à 2602.09 $\mu\text{g/ml/j}$. Ces résultats se situent dans l'intervalle cité par **Saci (2012)** avec des valeurs allant de 1210.125 à 3469.9 $\mu\text{g/ml/j}$.

D'après ces résultats on trouve que l'activité amylasique varie d'une souche à l'autre suivant la durée d'incubation dont la meilleure production de l' α -amylase est obtenue avec la souche S2 identifiée comme *Candida glabrata* avec une valeur de 2300 $\mu\text{g/ml/j}$ et biomasse de 26.67 g/l au 4^{ème} jour d'incubation.

Pour son meilleure production de l' α -amylase, *Candida glabrata* sera sélectionné pour le processus de purification et de caractérisation d'enzyme.

III.4. Purification partielle et étude des propriétés physicochimiques de l' α -amylase produite par *Candida glabrata*

L'extrait brut d'une fermentation au 4^{ème} j de *Candida glabrata* sur un milieu de base sert de matériel à purifier. Sa concentration en protéines est de 2.91 mg/ml et leur activité amylasique est de 84.06 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 15).

III.4.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Les résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15: Bilan de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium de l' α -amylase produite par *Candida glabrata*.

Etapas de purification	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification
Extrait brut	135	84.06	2.91	28.89	1
Précipité à 30 %	25	456	11.27	40.46	1.4
Précipité à 60 %	15	953.62	12.09	78.88	2.73
Précipité à 80 %	15	703.19	20.81	33.79	1.17

L' α -amylase est fractionnée par différentes concentrations de sulfate d'ammonium. La fraction saturée à 60 %, a donné une activité spécifique maximale d'enzyme de 78.88 U/mg, avec un degré de purification de 2.73 fois.

Sidkey et ses collaborateurs (2011) sont trouvés un résultat similaire pour une α -amylase d'*Aspergillus flavus* F₂Mbb avec une activité enzymatique de 202.05 (U/mg).

Une activité spécifique maximale d'enzyme (55.4 U/mg) est trouvée par **Nouadri (2011)**, qui est travaillé sur l' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21. Cette activité est donnée par la fraction saturée à 60 %, avec un degré de purification de 13.8.

Pour l' α -amylase de la levure *Filobasidium capsuligenum*, **De Mot et Verachtert (1985)** ont obtenu un taux de purification de 2, avec une saturation de 80 %. **Merabti (2006)** est trouvée un degré de purification de 4 et une activité spécifique de 32.2 U/mg pour une α -amylase produite par *Lipomyces sp.* avec une saturation de 50 %.

L'enzyme de la moisissure *Aspergillus oryzae* est précipitée à 70 %, avec un taux de purification de 2.08 (**Ramachandran et al., 2004**). Cette différence est probablement expliquée par l'existence d'isoenzymes, due à la différence des espèces.

Cette purification d'enzyme n'est pas suffisante. Il est donc nécessaire de la purifier d'avantage par l'application des techniques de purification plus affinées comme se qui décrite par **Abou-Zeid (1997)**, **Chao-Hsun et ses collaborateurs (2004)**, **Damodara et al., (2005)** et **El Safey et Ammar (2004)**, particulièrement si l'enzyme est destinée pour une exploitation alimentaire ou médicale.

Sans dialyse, les extraits 30, 60 et 80 % avaient une activité très faible, cela s'explique par la présence de sel d'ammonium dans le milieu, ce qui entraine la dénaturation de l'enzyme.

La comparaison des résultats des activités spécifiques des différentes fractions fait apparaitre que le précipité à 60 % a donné le meilleur résultat donc il sera retenu pour la caractérisation d'enzyme.

III.4.2. Etude de quelques propriétés physicochimiques de l' α -amylase partiellement purifiée

L'effet de plusieurs paramètres (pH, température, concentration en enzyme et en substrat) est étudié sur l'activité de l' α -amylase produite par *Candida glabrata* afin de connaître ses propriétés.

III.4.2.1. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme

Les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation du substrat et de la molécule enzymatique. Au niveau de la molécule enzymatique, cet effet dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat, à l'acte catalytique et/ou au maintien des structures secondaires et tertiaires de la protéine.

Selon **Nouadri (2011)**, la variation de pH peut être favorable ou défavorable à l'activité enzymatique. L'influence du pH sur l'activité amylasique donne une allure globale classique en forme de cloche.

L'activité enzymatique de l' α -amylase est déterminée à différentes valeurs de pH. Comme le montre la figure 14, le pH optimum pour une activité maximale est de 6.0 avec une activité de 1242.32 $\mu\text{g/ml}$.

On remarque que l'activité enzymatique est très faible à pH 3, puis croît jusqu'au pH 6.0. Au-delà ce pH, l'activité décroît jusqu'au pH 9 où elle s'atteint une valeur minimale (figure 14).

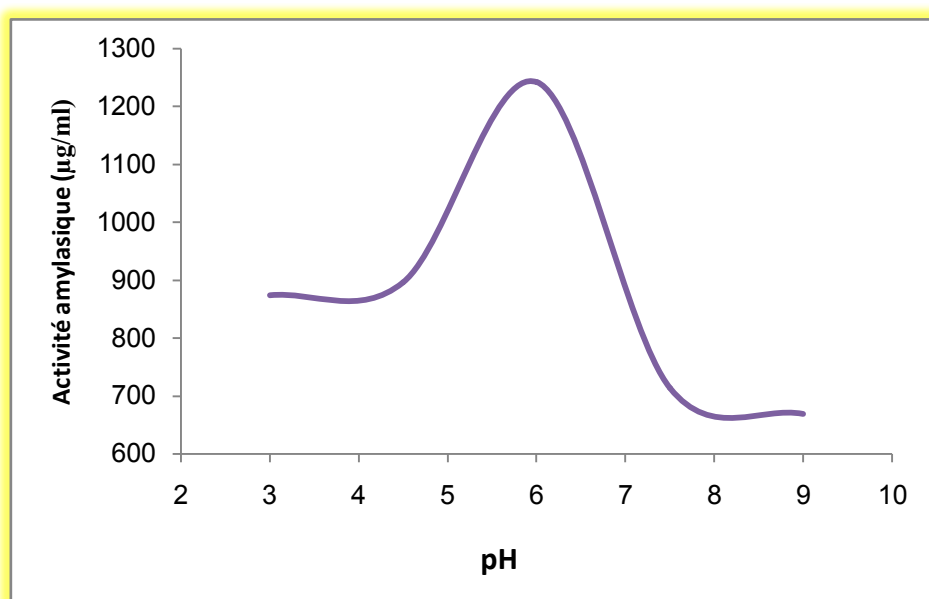


Figure 14: Effet du pH sur l'activité amylasique de *Candida glabrata*.

Donc, l' α -amylase étudiée est active à pH compris entre 5.5 et 6.5 et avec un maximum à pH 6, le même que celui rapporté par **Padmini et al. (2012)** et **Sidkey et al. (2011)** pour l' α -amylase d'*Aspergillus flavus* avec une activité de 900.00 $\mu\text{g/ml}$ et 52.48 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Des résultats similaires sont obtenus avec d'autres espèces fongiques telles que *Thermomyces lanuginosus* (Sindhu et al., 2009), *Aspergillus niger* (Kumari et al., 2012) et *Penicillium janthinellum* NCIM 4960 (Kunamneni et al., 2005), qui sont présentés des valeurs maximales d'activité amylasique à pH entre 5.0-6.0.

Les résultats obtenus restent peu inférieurs à ceux trouvés par Abou-Zeid (1997), qui a observé une activité maximale à pH 7.0. De plus, Chessa et al. (1999) ont rapporté que le pH optimum pour une activité amylasique maximale était de 7.5. Malhotra et al. (2002) ont conclu que l' α -amylase pure présente une activité maximale à une valeur optimale de pH de 8.0.

En conclusion, l' α -amylase de *Candida glabrata* a un pH optimum de 6, semblable à celui de la plupart des α -amylases fongiques, mais différent de celui des bactéries, qui ont plutôt des pH optimum alcalins (pH 8) (Cordeiro et al., 2002; De Souza et Martins, 2000).

III.4.2.2. Effet de la température sur l'activité de l'enzyme

L'influence de la température sur l'activité de l' α -amylase de *Candida glabrata*, est testée dans une gamme de 0 à 80 °C. L'enzyme présente une activité maximale à une température de 55 °C (Figure 15).

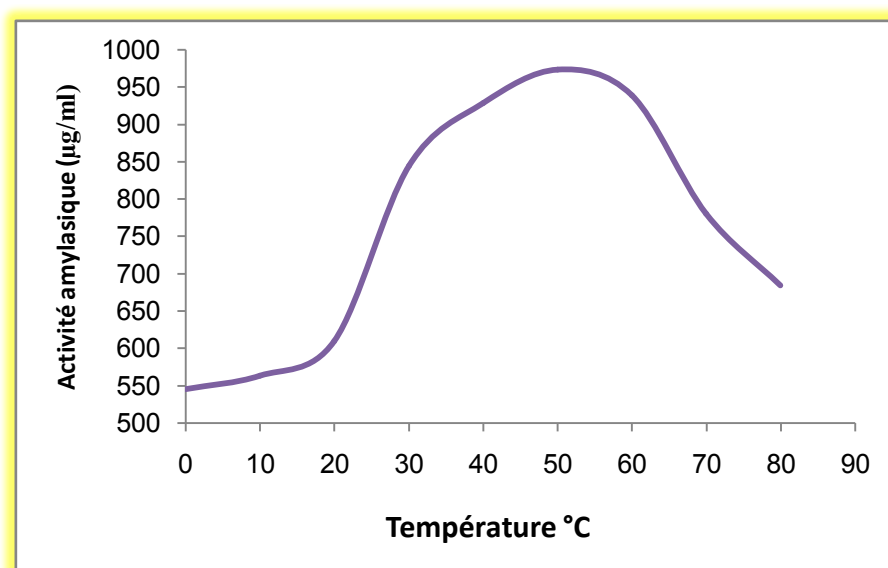


Figure 15: Effet de la température sur l'activité de l'enzyme de *Candida glabrata*.

De 0 à 20 °C, l'activité reste relativement faible. Elle se croît régulièrement dans la zone de température de 20 à 40 °C pour atteindre le maximum d'activité dans un intervalle de 50 à 55 °C. Elle chute brutalement lorsque la température passe de 60 à 65 °C.

De Mot et Verachtert (1987) ont obtenu le même résultat pour une amylase produite par le même genre, *Candida antarctica* CBS 6678. Aussi **Khoo et al. (1994)** ont trouvé que la température optimale pour une α -amylase pure était de 55 °C. **Chakraborty et al. (2000)** ont trouvé que l'activité maximale d'une α -amylase thermostable était observée à 50 °C.

Plus encore, ce résultat est proche de celui rapporté par **Merabti (2006)** pour une α -amylase produite par *Lipomyces sp.* Par ailleurs, les études menées sur *Lipomyces kononenkoae* et *Lipomyces starkeyi*, montrent que leurs α -amylases ont respectivement des températures optimales de 60 et 70 °C (**Eksteen et al., 2003; Kelly et al., 1985, Prieto et al., 1995**).

De plus, la température optimal d'activité de l' α -amylase de *Candida glabrata* est supérieur à celui d'autres levures tell que *Cryptococcus flavus* (**Wanderley et al., 2004**), *Filobasidium capsuligenum* (**De mot et Verachtert, 1985**) et *Schwanniomyces alluvius* (**Moranelli et al., 1987**), dont les activités optimales se manifestent à 50 °C.

Alors que **Nouadri (2011)** et **Padmini et al. (2012)** sont trouvé une maximum d'activité à 30 °C pour *Penicillium camemberti* PL21 (environ 70 µg/ml) et *Aspergillus flavus* (685.00 µg/ml) respectivement.

III.4.2.3. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique

Les résultats d'effet de la concentration d'enzyme sur l'activité amylasique sont représentés dans la figure 16.

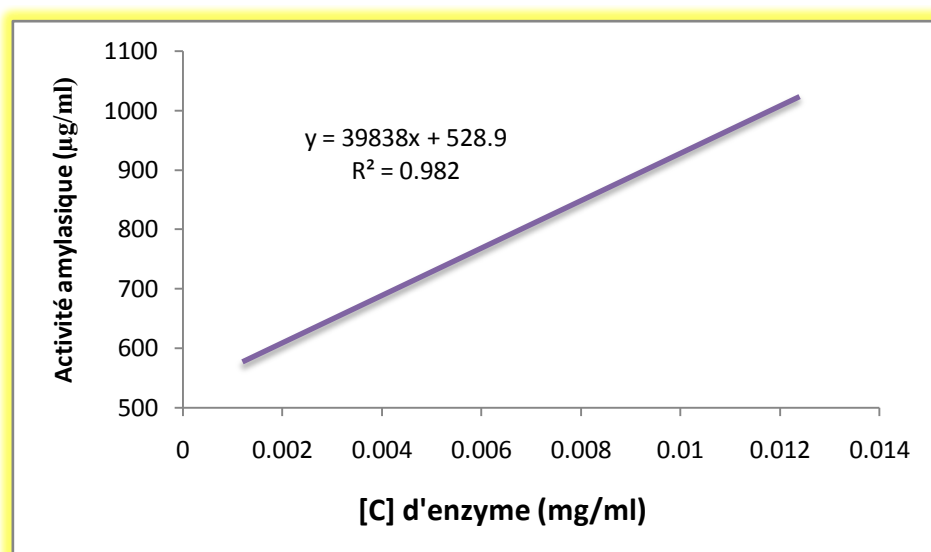


Figure 16: Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité amylasique de *Candida glabrata*.

Les résultats présentés dans la figure 16 indiquent que l'activité enzymatique d' α -amylase est augmentée avec l'augmentation de la concentration d'enzyme. Ces résultats sont conformes par l'observation de **West et al. (1967)** qui dit que dans une large gamme, la vitesse de l'activité enzymatique est directement proportionnelle à la concentration d'enzyme.

Abd El-Rahman (1990), **El-Safey (1994)**, **El-Safey et Ammar (2004)**, **Nouadri et al. (2010)** et **Sidkey et al. (1997)** ont rapporté la même observation qui est en accord avec le comportement général de la plupart des enzymes.

III.4.2.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme

L'activité enzymatique est mesurée à différentes concentrations d'amidon soluble. La figure 17 indique que l'activité maximale est obtenue pour une concentration en substrat de 0.4 % avec une activité de 955.94 $\mu\text{g/ml}$. Elle fait apparaître une courbe hyperbolique indiquant que la cinétique est de type michaélien.

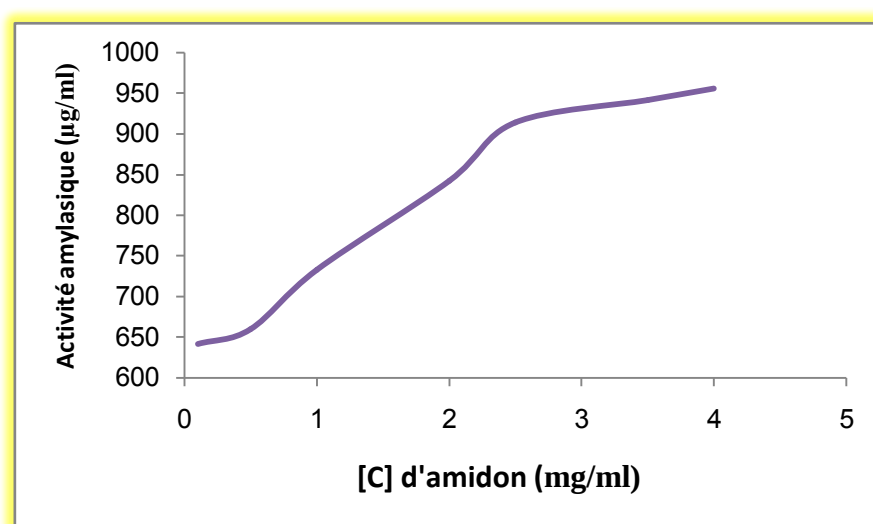


Figure 17: Effet de la concentration du substrat sur l'activité amylasique de *Candida glabrata*.

El-Safey et Ammar (2004) ont trouvé que l'activité amylasique a atteint le maximale (50.118 $\mu\text{g/ml}$) avec une concentration d'amidon soluble de 0.2 %. Alors que **Kuiper et al. (1978)** ont rapporté que l'activité maximale de l' α -amylase a été obtenue à concentration en substrat de 1.67 %. En plus, **Abd El-Rahman (1990)** a conclu que la concentration optimale d'amidon pour une activité maximale d'enzyme était entre 2-3 %.

III.4.2.5. Détermination des constantes cinétique d'enzyme (K_m et V_{max})

La figure 18 présente la représentation graphique suivant la méthode de **Lineweaver et Burk (1934)** qui permis de calculer les paramètres cinétiques d'enzyme (K_m et V_{max}), l'amidon soluble avec différentes concentrations (0.1 à 4.0 mg/ml) est utilisé comme substrat naturel de l'enzyme.

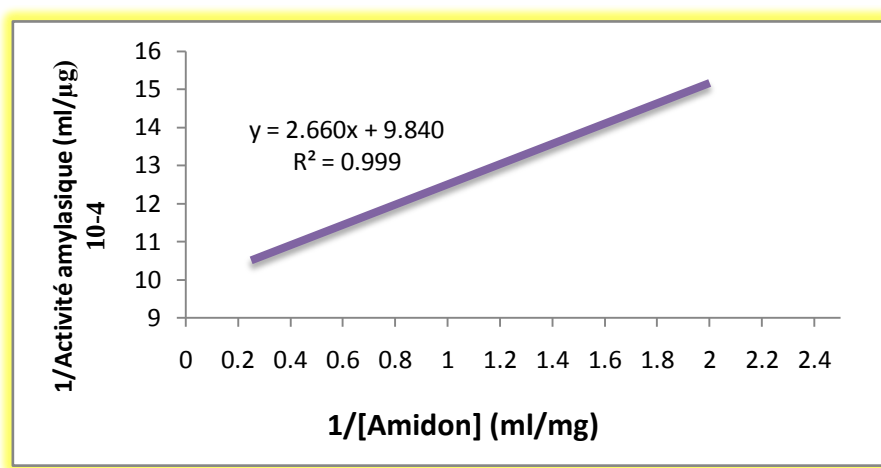


Figure 18: Tracé de Lineweaver et Burk de l' α -amylase produite par *Candida glabrata*.

Selon la représentation graphique de **Lineweaver et Burk (1934)** on a calculé les paramètres cinétiques d'enzyme à 55 °C et un pH optimal de 6 (un tampon phosphate 0.1 M), la constante cinétique de Michaelis ($K_m = 0.27 \text{ mg/ml}$) et la vitesse maximale ($V_{max} = 1016.26 \text{ }\mu\text{g/ml}$) (figure 18).

Nouadri (2011) est trouvé des valeurs de K_m et V_{max} respectivement 0.92 mg/ml et 30.5 $\mu\text{g/ml}$ à 30 °C et un pH optimal de 5.5. **Sidkey et al. (2011)** ont trouvé 0.5 mg/ml et 17.78 $\mu\text{g/ml}$ à 30 °C et un pH optimal de 6.4.

Selon **Sidkey et al. (2011)**, une grande valeur de V_{max} et une moins valeur de K_m sont des indicateurs que l'enzyme est plus efficace pour divers applications.

Donc, la purification partielle de l' α -amylase produite par *Candida glabrata* est réalisée seulement par la 1^{ère} étape de méthode classique (Précipitation par Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Elle est purifiée de 2.73 fois avec une activité spécifique de 78.88 U/mg. Les constantes cinétiques K_m et V_{max} pour l'hydrolyse de l'amidon soluble sont respectivement 0.27 mg/ml et 1016.26 $\mu\text{g/ml}$. La température optimale de l' α -amylase de *Candida glabrata* est de 55 °C, à pH optimal de 6.0. Comme l'enzyme n'est que partiellement purifiée, on suggère une purification plus affinées par chromatographie d'affinité.

Conclusion

Conclusion

L' α -amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme a été faite par certaines bactéries, levure et certains genres de moisissures.

Notre étude comporte deux axes de recherche. Le premier concerne la sélection et l'identification de souches levuriennes amylolytiques isolées du sol (Sidi Mastour El-Oued). La seconde partie est consacrée à la purification et la caractérisation de l' α -amylase produite dans un milieu naturel (sirop de datte).

En effet, l'isolement des levures, a permis de répertorier 5 souches (S1, S2, S3, S4 et S5). Pour la sélection, nous avons utilisé un milieu PDA à 4 % d'amidon. Seules les souches S2, S3 et S5 ont révélé des activités amylolytiques importantes. Ces dernières ont ensuite subi des tests pour son identification: études morphologique, biochimique et physiologique. Elles semblent être appartenir au genre *Candida glabrata* pour S2, *Rhodotorula mucilaginosa* pour S3 et *Candida lusitaniae* pour S5. Ces 3 souches précédemment sélectionnés et identifier ont été retenues pour la production enzymatique.

Par ailleurs, le milieu de fermentation, à base de sirop de dattes, est utilisé pour la production de l' α -amylase pour les souches sélectionnées. Une analyse physicochimique de sirop de datte est effectuée. Celle-ci montre que les sucres totaux représentent (25.17 %), avec un pH de 4.77 et un taux de cendres de 0.923 %. L'enrichissement du milieu avec de l'azote s'avère donc nécessaire, afin de l'équilibrer et de le rendre favorable au développement et à la production de l' α -amylase par les souches sélectionnés.

L'étude cinétique de la production de l' α -amylase sur le milieu de base, révèle que la production enzymatique atteint son maximum de 2300 $\mu\text{g/ml/j}$ après 4 jours d'incubation de *Candida glabrata* avec un taux de croissance maximale (biomasse) de 26.67 g/l.

La purification partielle de l' α -amylase par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation a permis l'obtention d'une activité spécifique de 78.88 U/mg et un degré de purification de 2.73 fois. Afin de mieux connaître l'enzyme produite, nous avons étudié ses propriétés ce qui permet de connaître les éventuelles applications. Les constantes cinétiques K_m et $V_{\max}$ pour l'hydrolyse de l'amidon soluble sont respectivement de 0.27 mg/ml et 1016.26 $\mu\text{g/ml}$. La température optimale de l'enzyme partiellement purifiée est de 55 °C et un pH optimum de 6.0.

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui seront réalisés dans le cadre d'autres travaux complémentaires qui s'intéressent à:

- La recherche de nouvelles espèces hyper-productrices d'enzyme ayant un intérêt industriel.
- La recherche chez *Candida glabrata* d'autres enzymes d'intérêt, pouvant ouvrir à d'autres applications industrielles.
- L'identification des souches isolées par des tests d'assimilation d'autres substrats et par les techniques de la biologie moléculaire.
- La purification plus poussée de l'enzyme pour une éventuelle utilisation de l' α -amylase en industries alimentaires ou pharmaceutique est recommandée (Dialyse, électrophorèse SDS, chromatographie d'exclusion moléculaire... etc).
- L'augmentation de la stabilité thermique de l'enzyme par des techniques d'immobilisation.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abd El-Rahman, E. M., (1990).** *Studies on some thermophilic bacterial strains*. These de Doctorate, université Al-Azhar, Cairo, Egypt.
- Abou-Zeid, A. M. (1997).** Production, purification and characterization of an extracellular α -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. *Microbios.*, 89 (358), 55-66.
- Abu, E. A., Ado, S. A. and James, D. B. (2005).** Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *African Journal of Biotechnology*, 4 (8), 785-790.
- Acharya, D. K., Shukla, R. M., Gami, P. N. and Shah, I. J. (2014).** Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. *Basic Research Journal of Microbiology*, 1 (4), 01-10. En ligne: <http://www.basicresearchjournals.org>
- Acourene, S. et Tama, M. (2001).** Utilisation des dattes de faible valeur marchande (Rebuts de deglet-nour, tinissine et tantboucht) comme substrat pour la fabrication de la levure boulangère. *Revue des Energies Renouvelables.*, 1-10.
- AFNOR (NFV), (1974).** *Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes, Détermination de l'acidité titrable*. Ed. Association Francaise de Normalisation (AFNOR).
- Aït Kaki, A. (2004).** *Isolement de la moisissure Rhizopus oryzae et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l' α -amylase*. Thèse de magistère, université Mentouri, Constantine.
- Ait kaki, A., Leghlimi, H., Dakhmouche, S., Bennamoun, L. et Meraihi, Z., (2012).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*, 6 (1), 1-17.
- Al-farsi, M. (2002).** Clarification of date juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 241–245. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2003.00669.x

- Al-farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M. and Al-Rawahy, F. (2007).** Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food Chemistry*, 104, 943–947. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.051
- Al-hooti, S. N., Sidhu, J. S., Al-saqer, J. M. et Al-thman, A. (2002).** Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase cellulase enzyme treatment. *Food Chemistry*, 79, 215–220.
- Alkhateeb, A. (2008).** Comparison effects of sucrose and data palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*phoenix dactylifera L*). *American journal of biotectchnology and biochemistry*, 4 (1), 19-23.
- Allen, N. H. and Ahearn, D. G. (1987).** Ecology of Aquatic Yeasts In: Rose, A. H. and Harisson, J. S. (eds). *The yeasts*, Vol. 1, *Biology of yeast*, 2nd Ed. London: Academic Press.
- Amellal née Chibane, H. (2008).** *Aptitude technologiques de quelques variétés communes de dattes: Formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé.* Mémoire de doctorat en génie alimentaires, université M'hamed Bougara, Boumerdes.
- Arnaud, A. et Guiraud, J. P. (1999).** *Le métabolisme microbien.* In: Scriban, R. *Biotechnologie*, 5^{ème} Ed. Paris: Edition Techniques et Documentation Lavoisier.
- Arpana, M., Neeraj, K. A., Varun, G., Gulab, S. and Anita, Y. (2013).** Purification and characterization of amyloglucosidase produced by *Aspergillus awamori* NA21 under solid state fermentation using tapioca powder. *Octa Journal of Biosciences*, 1 (2), 122-131.
- Audigie, C. L., Fagerella, J. et Zonszain, F. (1984).** *Manipulation d'analyse biochimique.* Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- Baangood, S. M. and Shamshad, M. A. (1984).** Chemical composition of major dates cultivars in the United Arab Emirates. *Journal in date palm*, 3 (2), 381-394.
- Bacha, A. (2008).** *Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure saccharomyces cerevisiae sur substrat a base de datte.* Mémoire de magister en technologie alimentaire, université El-hadj Lakhdar, Batna.
- Bakri, Y., Jacques, P. H. et Thonart, P. H. (2003).** Xylanase production by *Penicillium canescens* 10 10c in solidstate fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, (108), 737-748.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (2000). *Yeast: Characteristics and identification*, 3rd Ed. Cambridge University Press.

Barny, J. B. and Hansen, M. (1990). The debate between traditional management theory and organizational economics: Sstantive differences or inter-group conflict? *Academy of Management Review*, 15, 382-93.

Bedaida, I. (2014). *Optimisation séquentielle de production du glutamate à partir de Corynebacterium glutamicum 2262 sur jus de datte: Utilisation de deux modèles statistiques (PlackettBurman et Box-Behnken)*. Thèse magister en microbiologie, université Ferhat Abbas, Setif.

Belguedj, N. (2015). *Préparations alimentaires à base de dattes en Algérie: Description et diagrammes de fabrication*. Mémoire magister en biotechnologie alimentaire, université Mentouri, Constantine.

Ben Abbes, F. (2011). *Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes «Phoenix dactylifera L.»*. Mémoire magister en génie des procédés pharmaceutiques, université Ferhat Abbas, Setif.

Benagga, S. et Gougui, S. (2014). *Etude bibliographique des caractéristiques physicochimiques et biochimiques de sous produits des dattes*. Mémoire de licence en Biochimie fondamentale et appliquée, université Kasdi Merbah, Ouaregla.

Benahmed, D. A. (2007). *Etude et optimisation d'un processus de fabrication traditionnelle de vinaigre à partir de deux variétés de dattes communes cultivées dans le sud algérien*. Mémoire de magister en génie alimentaire, université M'Hamed Bougara, Boumerdès.

Benahmed, D. A. (2012). *Analyse d'aptitude technologique de poudres de datte (phoenix dactylifera .L) améliorées par la spiruline: Etude des propriétés théologiques nutritionnelles et antibactériennes*. Thèse de doctorat en Technologie Alimentaire, université M'hamed Bougara, Boumerdes.

Benaouida, K. (2008). *Etude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum*. Thèse de magister en Biotechnologie microbiennes, université Mentouri, Constantine.

- Benchabane, A., Kechida, F., Belaloui, D., Aoudjit, R. et Ould el hadj, M. (2012).** Valorisation de la datte par la formulation d'une boisson à base de lait et de jus d'orange. *Algerian Journal of Arid And Environment (AJAE)*, 2 (1), 1-5.
- Benchelah, A. C. et Maka, M. (2006).** Les dattes, de la préhistoire à nos jours. *Phytothérapie (ethnobotanique) Springer*, (1), 43 - 47.
- Bendjelloul, N. et Berraghda, A. (2014).** *Caractérisations biochimiques des trois variétés de dattes (Ghars, Déklet-Nour et Dékla-Beida)*. Mémoire de Licence en Biochimie fondamentale et appliquée, université Kasdi merbah, Ouaregla.
- Benharzallah, H. et Bouhoureira, S. (2014).** *Effet de trois produits à base de dattes sur quelques germes de la flore intestinale*. Mémoire d'ingénieur d'état en sciences agronomique, université Kasdi Merbah, Ouaregla.
- Benmouaffeki, D. (2011).** *Etude de la variabilité spatio-temporelle de la salinité en milieux sableux. Cas de la palmeraie de l'université de Ouargla*. Mémoire d'ingénieur d'état en Agronomie saharienne, université Kasdi merbah, Ouargla.
- Bensamira, S. (2006).** *Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel*. Mémoire du Magistère en Biochimie-microbiologie appliquée, université Mentouri, Constantine.
- Bensmail, S. (2012).** *Optimisation de la production de la protéase acide par Aspergillus niger sur milieu solide: Purification et caractérisation*. Mémoire de magister en Sciences, université M'Hamed Bougara, Boumerdès.
- Bernfeld, P. (1955).** *Amylases* In: Clowck, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.). *Methods in enzymology*. 1, 149-157. Academic press, New York.
- Blin, C. P. (2002).** *Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre Sporidiobolus: mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué*. Thèse de doctorat en Ecole nationale supérieure de biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation, université de Bourgogne, France.
- Boiron, P. (1996).** *Organisation et biologie des champignons*. Paris: Edition Nathan.
- Booij, I., Pionbo, G., Risterucci, J. M., Coupe, M., Thomas, D. et Ferry, M., (1992).** Etude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation

variétale de divers cultivar de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal Fruits*, 47 (6), 667-677.

Botton, B. (1991). *La physiologie des levures*. In: Larpent J. P. (ed.), *Biotechnologie des levures*. Paris: Edition Masson.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P. H., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y et Veau, P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle* (2^{ème} édition). Paris: Edition Masson.

Boucherit, Z. (2011). *Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de sebkha*. Mémoire de magister en Microbiologie appliquée, université Mentouri, Constantine.

Bouchet, P. H., Guignard, J. L. et Villard, J. (1999). *Les champignons: Mycologie fondamentales et appliquée*. Paris: Edition Masson.

Boudraa, S. (2004). *La production de biomasse *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu a base d'extrait de datte variété sèche: «Mech-Degla»*. Mémoire d'Ingénieur, Institut d'agronomie, Batna.

Bouix, M. et Leveau, J. Y. (1991). *Les levures* (vol: 2). Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Bouix, M. et Leveau, J. Y. (1999). *Production des enzymes*. In: Scriban, R. (Ed), *Biotechnologies*. Paris: Edition Lavoisier.

Boukhelkhal, N. (2013). *Cartographie de la salinité par deux méthodes différentes en milieu oasien. Cas de l'exploitation phoenicicole de l'université de Ouargla*. Mémoire de Master en Sciences agronomiques, université Kasdi merbah, Ouargla.

Boulal, A., Kihal, M. and Khelifi, C. (2017). Fermentative strength of yeasts strain, Naturally isolated using common date in south-west of Algeria. *International Journal of Chemical Technology Research*, 10 (1), 180-188.

Bouras, H., Bourega, A. et Khineche, S. (2006). *Influence des facteurs physiologiques et nutritionnels sur la production de la biomasse microbienne (levure boulangère)*. Mémoire de master en Biochimie appliquée, université de kasdi Merbah, Ouargla.

- Bourgeois, C. (2003).** *Les vitamines dans les industries agroalimentaires*. Paris: Edition Techniques et Documentations-Lavoisier
- Bourgeois, C. M. et Leveau, J. Y. (1991).** *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires* (vol: 2). Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.
- Bouzegag, H. (2007).** *Recherche et identification des souches de levures types sahariens issus de la datte et du vinaigre traditionnelle de dattes*. Mémoire d'étude supérieur en Microbiologie, université Kasdi Merbah, Ouargla.
- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brawn, S. H. and Kelly, R. M., (1993).** Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental Microbiology*; 59 (8), 2614-2621, DOI: 0099-2240/93/082614-08\$02.00/0
- Brzozowski, A. M. et Davies, G.J. (1997).** Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, 36 (36), 10837-10845, DOI: 10.1021/bi970539i
- Carlile, M. J. et Watkinson, S. C. (1994).** *The Fungi*. New York: Academic Press.
- Chakraborty, K., Bhattacharyya, B. K. and Sen, S. K. (2000).** Purification and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 45 (3), 207-210.
- Chang, K., You-Liang, P. and Chong-Yao, S. (1995).** Purification and properties of a thermostable alpha amylase from the thermophilic fungus. *Acta Microbiologica Sinica*, (37), 102-110.
- Chao-Hsun, Y. and Wen-Hsiung, L. (2004).** Purification and properties of a maltotriose-producing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology*, (35), 254-59.
- Chatterton, J. R., Vogelsong, K. M., Lu, Y. C., Ellman, A. B. and Hudgens, G.A. (1996).** Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology Journal*, 16 (4), 344 - 348.

- Cherif, A. (1993).** *Essai d'isolement et d'identifications de levures sauvages à partir substrats naturels pour utilisation boulangère.* Mémoire d'ingénieur, institue d'agronomie, Elharrach, Alger.
- Chessa, J. P., Feller, G. and Gerday, C. (1999).** Purification and characterization of heatstable α -amylase secreted by the *psychrophilic bacterium* TAC 240B. *Canadian Journal of Microbiology*, 45 (6), 452-457.
- Cordeiro, C. A., Leal, M. L. and Luciano, A. B. (2002).** Production and proprieties of α -amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian journal of microbiology*, 33 (1), São Paulo.
- Daas Amiour, S. (2009).** *Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (Phoenix dactylifera L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique.* Mémoire de Magister en Biochimie appliquée, université El Hadj Lakhdar, Batna.
- Dakhmouche-Djekrif, S. (2016).** *Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure Clavispora lusitaniae ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides.* Thèse de doctorat en Sciences, université Mentouri, Constantine.
- Damodara, R., Mendu, B. V., Ratnam, A., Purnima, C. and Ayyann, A. (2005).** *Affinity chromatography of α -amylase from Bacillus licheniformis.* Département de pédiatrie, Division des maladies infectieuses, Faculté de médecine de l'université Johns Hopkins.
- Davet, P., and Rouxel, F. (1997).** *Detection et isolation des champignons du sol.* Paris: INRA.
- De mot, R. and Verachtert, H. (1985).** Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1474-1482.
- De Mot, R. and Verachtert, H. (1987).** Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. *European Journal of Biochemistry*, 164,643-654.
- De Souza, C. E and Martins, M. L. (2000).** Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Martins Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 298-302
- Delal, H. (2016).** *Évaluation et modélisation de la dynamique des populations microbiennes en relation avec les caractères édaphiques des sols de carrière de Terga (Ain Témouchent) en vue de leur revégétalisation.* Mémoire de Doctorat, université Ahmed Ben Bella, Oran.

- Dendouga, W. (2006).** *Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite.* Mémoire de Magister en Biochimie-Microbiologie appliquées, université Mentouri, Constantine.
- Desmazeaud, M. et Hermier, J. (1968).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 8 (4), 565-577.
- Dixon, M. and webb, E. G. (1964).** *Enzymes*, 2nd Ed. New York: Academic Press.
- Djouab, A. (2007).** *Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de dattes des variétés sèches.* Mémoire de magister en génie alimentaire, université M'Hamed Bougara, Boumerdès.
- Djoudi, I. (2013).** *Contribution à l'identification et à la caractérisation de quelques accessions du palmier dattier (Phoenix Dactylifera.l) dans la région de Biskra.* Thèse magister en sciences agronomiques, université Mohamed Kheider, Biskra.
- Dollé, V. et Toutain, G. (Eds). (1990).** *Note technique: Valorisation de la datte.* France: Estantove Pierre.
- Dubey, A. K., Suresh, C., Kavitha, R., Karanth, N. G., and Umesh-Kumar, S. (2000).** Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. *FEBS Letters*, 471 (2), 251-255.
- Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. S and Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Dufresne, P. et Guy, S. G. (2014).** *Identification des champignons d'importance médicale: Stage de laboratoire.* Institut national de santé publique, Québec.
- Egas, M. C., Da Cota, M. S., Cowan, D. A, and Pires, E.M. (1998).** Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* ork A2: Purification and biochemical characterisation. *Extremophiles*, 2 (1), 23-32.
- Eksteen, J. M., Steyn, A. J., van Rensburg, P., Cordero, R. R. and Pretorius, I. S. (2003).** Cloning and characterization of a second alpha-amylase gene (LKA₂) from *Lipomyces*

kononenkoe IGC4052B and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *InterScience*, 1, 69-78.

El Gendy, M. M. A. (2012). Production of glucoamylase by marine endophytic *Aspergillus* sp. JAN-25 under optimized solid-state fermentation conditions on agro residues. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6 (4), 41-54.

El Safey, E. M. et Ammar, M.S. (2004). Purification and characterization of α -amylase isolated from *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. *Assiut university bulletin for environmental researches*, 7 (1).

El-Safey, E. M. (1994). *Production of microbial α -amylases under solid-state incubation conditions in the open air*. These de Doctorate, université Al-Azhar, Cairo, Egypt.

Emenike, O. B., Chibuzo, C. F. and Sabinus, O. E. (2015). Characterization of partially purified α -amylase from germinating African breadfruit (*Treculia africana*) Seeds. *International Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, 5 (1), 15-21. DOI: 10.5829/idosi.ijpms.2015.5.1.1111

Espiard, E. (2002). *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.

Favier, J., Ireland-Ripert, J., Laussucq, C. et Feinberg, M. (1993). *Répertoire générale des aliments: Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique*. Paris: Corlel SA.

Felipe, F. T. and Silvi,a F. C. (2008). Rhodotorula infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Revista iberoamericana de micología*, 25, 135-140.

Ferhat Hamida, S. et Laklouka, N. (2015). *Contribution à l'étude de l' α -amylase levurienne: Optimisation des conditions de production*. Mémoire de Master en Biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued.

Fethi, H. A. et El Kouhtani, M. N. (1979). *Production de dattes dans le monde arabe et Islamique*. Université Ain Chems.

Fogarty, W. M. et Kelly, C. T. (1990). *Microbial Enzymes and Biotechnology* (2^{ème} Ed). London: Elsvier applied science.

- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch, C., Silva, J. C. P. and Crossi de Sa, M. F. (2000).** Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid α -amylase and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2166-2173.
- Galzy, P., Moulin, G. et Adrian, L. (1996).** Présence et utilisation des levures en alimentation humaine. *Industries alimentaires et agricoles*, 113 (2), 656-662.
- Gancedo, C. and Senano, R. (1989).** Energy-Yielding Metabolism. In: Rose, A. H. and Harrison, J. S. (eds). *The yeast, Metabolism and physiology of yeast*, (2nd Ed) London: Academic Press.
- Gilles, P. (2000).** *Cultiver le palmier dattier*. France: Cirad.
- Golubev, W. I., Manukyan, A. R and Lazarev, P. I. (1984). Zhurnal Obshchei Biologii. *Journal of General Biology, in Russian*, 45, 507.
- Guinet, R. et Godon, B. (Eds.). (1994).** *La panification Française*. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.
- Guiraud, J. P. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Paris: Edition Dunod.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A. and Plemenitaš, A. (2005).** *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya*. Netherlands: Springer.
- Gupta, A., Gupta, V. K., Modi, D. R. et Yadava, L. P. (2008).** Production and characterization of α - amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnologie*, 7 (3), 551-556. ISSN 1686-296X.
- Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozakik, K., Kawai, S. and Ito, S. (2001).** Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the *Alkaliphilic Bacillus* isolates KSM-K38. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (4), 1744-1750.
- Halwyn, M. A., Lercterc, J. M., King, N., Belonger, M., Legris, M. et Frenett, Y. (2002).** *Les risques à la santé associés à la présence de moisissure en milieu interieur, Rapport scientifique*. ISBN Quebec, Canada.
- Hamad, B. (2009).** *Contribution à l'étude de la contamination superficielle bactérienne et fongique des carcasses camelines au niveau de l'abattoir d'El-Oued*. Mémoire de Magister en médecine vétérinaire, université Mentouri, Constantine.

- Hammer, E., Krowas, D., Schafer, A., Specht, M., Franche, W. and Schauer F. (1998).** Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 2215-2219.
- Hammia, I. (2012).** *Impact de l'irrigation sur la salinisation des sols dans les palmeraies de Oued Righ*. Mémoire d'ingénieur d'état en Sciences agronomiques, université Kasdi merbah, Ouargla.
- Haq, I. U., Rani, S., Ashraf, H. and Qadeer, M.A. (2002).** Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Sciences*, 2 (2), 73-75.
- Hencké, S. (2000).** *Utilisation alimentaire des levures*. Mémoire de Docteur en Pharmacie, université Henri Poincare, Nancy i.
- Hyun, H. H., Zeikus, J. G. (1985).** Simultaneous and enhanced production of thermostable amylases and ethanol from starch by cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydro sulfuricum*. *Applied Environmental Microbiology*, 9 (5), 1174-1181.
- Ibukun, E. O. and Akindumila, F. (1998).** Extracellular amylase production by isolates of Bacilli micro-organism cultured on different starchy food broths. *The Nigerian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, 13, 91-95.
- Jackard, A. (2008).** *Composition des milieux de culture*. In: Development of an Industrial Biotechnology Process: Metabolic basis of product formation and development of medium, HES-SO Valais.
- Janecek, S. (1994).** Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *European Journal Biochemistry*, 224, 519–524.
- Kelly, C. T., Moriarty, M. E. and Fogarty, W. M. (1985).** *Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi**. Applied Microbiology and Biotechnology Publisher, 22 (5), 352 – 358.
- Kemassi, H. (2015).** *Essai de production de levure alimentaire cultivée sur moût de dattes de faible valeur marchande*. Mémoire de master en biotechnologie végétale, université Kasdi Merbah, Ouaregla.

- Kherraz, Z. et Lobri, S. (2015).** *Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures.* Mémoire de Master en Biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued.
- Khoo, S. L., Amirul, A. A., Kamaruzaman, M., Nazalan, M. and Azizan, M. N. (1994).** Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiol (Praha)*, 39 (5), 392-398.
- Kocher, G. S et Katyal, P. (2003).** *Use of potato starch for extracellular amylase production by a yeast isolate.* India: Ludhana.
- Komagata, K., Nakase, T. and Katsuya, N. (1964).** Assimilation of hydrocarbons by yeasts: I. Preliminary screening. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 10, 313-321.
- Kreger van, N. J. (1984).** *The yeast, a Taxonomic Study* (Ed: 3). Amsterdam: Cletus P. Kurtzman et Jack W. Fell.
- Kuiper, J., Roels, J. A. and Zuidwedg, M. H. J. (1978).** Flow through viscometer for use in the automated determination of hydrolytic enzyme activities: Application in protease, amylase, and pectinase assays. *GistBrocades N. V. research and development, Delft, the Netherlands Analytical biochemistry*, 90, 192-203.
- Kumari, S. Bhattacharya, S. and Das, A. (2012).** High-yield chemical synthesis of hexagonal ZnO nanoparticles and nanorods with excellent optical properties. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 2 (2), 836- 846.
- Kunamneni, A., Perumal, K. and Singh, S. (2005).** Optimization of process parameters for α -amylase production using Artificial Neural Network (ANN) on agricultural wastes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2, 168-171.
- Labrecque, M. H. (2003).** *Étude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène.* Mémoire de maîtresses sciences, université Laval.
- Lagane, C. (2007).** *Rôle de l'IL₃ et des ligands de PPAR _{γ} dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de Candida albicans, Implication de PPAR _{γ} .* Thèse de Doctorat en Immunopathologie, oncogénèse et signalisation cellulaire, université Toulouse III, Paul Sabatier, France.
- Lagzouli, M., El Kettani, Y., Aitounejjar, A., Elyachioui, M. and Jadal, M. (2017).** Optimization of biomass and glucoamylase production by *Candida famata* using response

surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 16(5), 238-246. DOI: 10.5897/AJB2016.15774

Laisne, G. and Brown, M. (1972). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 101-242.

Lambiote, B. (1983). *Some aspect of the role of dates in humain nutrition, The first symposium on dates palm.* King Faysal university, El Hassa Kingdom of Saudi Arabia.

Larpent, G. M and Sanglier, J. J. (1992). *Biotechnologies: Principes et méthodes.*

Larpent, J. P. (1990). *Biotechnologie des levures.* Paris: Edition Masson.

Larpent, L. P. et Larpent-Gourgaud, M. (1993). *Mémento technique de microbiologie*, 3^{ème} éd. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Larpent, L. P. et Larpent-Gourgaud, M. (1997). *Mémento technique de microbiologie*, 8^{ème} éd. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Leclerc, H., Meyer, A. et Deiana, J. (1995). *Cours de microbiologie générale: Nouveau programme, Biosciences et Techniques.* Paris: Doin Editeurs.

Leveau, I. V. et bouix, M. (Ed). (1993). *Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel.* Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Leveau, J. Y. et Bouix, M. (1993). *Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel* (8^{ème} éd). Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.

Little, A. D. (2004). Comité Biotechnologies de LEEM.

Lodder, J. (1971). *The yeasts, a taxonomic study*, 2^{ème} Ed. North Holland, Amsterdam: Londres.

Mahnaaz, K., Shaukat, S. K., Zafar, A. and Arshiya, T. (2010). Production of Single Cell Protein from *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing Fruit Wastes. *Nanobiotechnica Universale*, 1 (2), 127-132.

Malhotra, R., Noorwez, S. M. and Satyanarayana, T. (2002). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31 (5), 378-384

- Malloch, D. (1997).** *Moulds: their isolation, cultivation and identification*. Department of botany, university of Toronto.
- Mamo, G. and Gessesse, A. (1999).** Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25.
- Mathieu, C. et Pieltain, F. (2009).** *Analyse chimique des sols*. Paris: Ed. Techniques et documentations Lavoisier.
- Mattalah, M. A. A. (1970).** *Contribution à l'étude de la conservation des dattes variété Deglet Nour: Isotherme d'adsorption et de désorption*. Mémoire d'ingénieur agronome, INA. El Harrach, Alger.
- Mazur, A. K. et Nakatani, H. (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306 (1), 29-38.
- Merabti, R. (2006).** *Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien*. Thèse magister en Biochimie et microbiologie appliquées, université Mentouri, Constantine.
- Mercier, C. (1997).** *Transgénèse et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnelles*. Nord-France: Frend G.
- Messaoudi, Z. et Bekkari, H. (2016).** *Contribution à l'étude de la production enzymatique de quelques espèces fongiques isolées à partir des milieux extrêmes*. Mémoire de Master en Biochimie appliquée, université Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued.
- Meyer, A., Deiana, J. et Bernard, A. (2004).** *Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigé*. Paris: Doin Editeurs.
- Mimouni, Y. et Siboukeur, O. (2011).** Etude des propriétés nutritives et diététiques des sirops de dattes extraits par diffusion, en comparaison avec les sirops à haute teneur en fructose (isoglucoses), issus de l'industrie de l'amidon. *Annales des Sciences et Technologie*, 3 (1), 1-11.
- Mimouni, Y., Siboukeur, O. and Bayoussef, Z. (2014).** Fructose-rich syrup from Ghars cultivar dates (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26 (11), 963-969. DOI: 10.9755/ejfa.v26i11.16755

- Momein, H., Ahmed, M., Gehan, M. and Hesham, M. (2003).** Improvement of Cell Wall Degrading Enzymes Production by Alginate Encapsulated *Trichoderma sp.* *Food Technology Biotechnology*, 41 (3), 219-225.
- Moranelli, F., Yaguchi, M., Calleja, G. B and Nasim, A. (1987).** Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Biochemistry and Cell Biology*, 65(10), 899-908.
- Morvan, J. (2010).** Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.
- Multon, J. L. (1992).** *Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides dans les I.A.A.* Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- Multon, J. L. et De Reynal, B. (1984).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires (4^{ème} Ed). Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.
- Multon, J. L., (1982).** *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés-céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux*, Vol. 2. Paris: Technique & Documentation Lavoisier.
- Munier, P. (1973).** *Le palmier dattier. Techniques agricoles et productions tropicales* (5^{ème} Ed). Paris: Maisonneuve et Larose.
- Nahar, S., Hossain, F., Ferozal, B. et Halim, M. A. (2008).** Production of glucoamylase by *Rhizopus sp.* in liquid culture. *Pakistan Journal of Botany*, 40 (4), 1693-1698.
- Nixon, R. W. et Carpenter, B. (1978).** *Dates in united sates*. United states department of agriculture information, Bulletin Prepared by Science and Education Administration.
- Nouadri, T. (2011).** *L'α-amylase de Penicillium camemberti PL21: Production, Purification, Caractérisation et immobilisation*. Thèse de Doctorat d'Etat, Option Biochimie-Biotechnologies, université Mentouri, Constantine.
- Noui, Y. (2001).** *Optimisation de la production de la biomasse saccharomyces cerevisiae cultivée sur extrait de datte*. Mémoire D'ingénieur Institut D'agronomie, université El-hadj Lakhdar, Batna.
- Osterlund, B. and Janson, J. C. (1997).** A strategic Approach to protein purification. *Pharmacia. Biotechnol.*, 2 (3), 8-10.

- Oteng-Gyang, K. (1984).** *Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds*. Paris: Technique & Documentation Lavoisier.
- Padmini, N. D., Bhattacharya, S., Das, A. and Rajan, S. S. (2012).** Solid-state fermentation and characterization of α -Amylase from a Rhizospheric Isolate of *Aspergillus flavus* associated with *Mangifera indica*. *Annals of Biological Research*, 3 (8), 4082-4090.
- Pagot, Y., Endrizzi, A., Nicaud, J. M. and Berlin, J. M. (1997).** Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve gamma-decalactone production yields. *Letters in Applied Microbiology*, 25 (2): 113-116.
- Panchal, C. J. (1990).** *Yeasts strain selection*. United States of America (USA): Marcel Dekker.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. and Mohan, R. (2000).** Advances In: Microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry* (31), 135-152.
- Park, C. S., Chang, C. C., Kim, J. Y., Ogrydziak, D. M., Ryui, D. D. Y. (1997).** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (11), 6876-6881.
- Phaff, H. G., Miller, M. W and Mrak, E. K. (1968).** *The life of yeasts*. Harvard University Cambridge, Massachusetts.
- Phaff, H. G., Miller, M. W and Mrak, E. K. (1978).** *The life of yeasts*. Harvard University Cambridge, Massachusetts.
- Phaff, H. J and Starmer, W. T. (1987).** *Yeast associated with Plants, Insects and Soil*. In: Rose, A. H., Harrison, J. S. (Eds.). *The yeast*, (Vol. 1, 2nd Ed.). Biology of yeast. London: Edition Academic Press.
- Pierquin, A. L. (2010).** *Mycoses opportunistes et immunodépression*. Thèse pour obtenir le Diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy 1.
- Pramayon, S. (2001).** *Les Candidoses systémiques en réanimation: Difficultés diagnostiques et thérapeutiques, attitude consensuelle actuelle*. Mémoire de Doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble.

- Prieto, J. A., Bort, B. R., Martinez, J., Randez, G. F., Buesa, C and Sanz, P. (1995).** Purification and Characterisation of new alpha- amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochemistry and Cell Biology*, 73 (1-2), 41-9.
- Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C. R and Pandey, A. (2004).** Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (2).
- Raviyan, P., Juming, T. and Barbara, A. R. (2003).** Thermal stability of a-amylase *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 62-69.
- Redecker, D. (2002).** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology*, 153, 125-130.
- Refice, Z., Abdelkrim, S. et Messaoudi, S. (2011).** *Optimisation d'un milieu de culture à base de datte pour la production de levure boulangère «Saccharomyces cerevisiae» et le dénombrement de la flore fongique.* Diplôme d'Ingénieur en Contrôle de qualité et analyses, université Mohamed Khider, Biskra.
- Regnault, J. P. (1990).** *Microbiologie générale*, 1^{er} Ed. Paris: Ed. Vigot.
- Retima, L. (2015).** *Caractérisation morphologique et biochimique de quelque cultivar du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) dans la région de Foughala (Wilaya du Biskra).* Thèse magister en sciences agronomique, université El-hadj Lakhdar, Batna.
- Richard, R. (1972).** *Eléments de biologie végétale*. Paris: Edition Touchet.
- Richards, L. A. (1969).** *Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils*. Agr. Handbook.
- Riviere, J. (1975).** *Les applications industrielles de la microbiologie*. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (Ed.).
- Saci, A. (2012).** *Production d'alpha-amylase par Streptomyces sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange.* Thèse magister en Ecologie, université Mentouri, Constantine.
- Sadiq, A., Zeeshan, K., Bashir, A., Ibrar, K. et Javid, A. (2014).** Production of Single Cell Protein from Orange Peels Using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Global*

Journal of Biotechnology & Biochemistry, 9 (1), 14-18. DOI: 10.5829/idosi.gjbb.2014.9.1.82314

Saito, K., Kawamura, Y. et Oda, Y. (2003). Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *Id Microbiology Biotechnology*, 30 (7), 440-444.

Sawaya, W. N., Khalil, J. K., Khatcha-Dourian, H. A., Safi, W., and Mashadi, A. S. (1983). 'Sugars, Tannins and Some Vitamins Contents of Twenty Five Date Cultivars Grown in Saudi Arabia at the Khalal (Nature Color) and Tamer (Ripe) Stages'. *The First Symposium on the Date Palm*, King Fayçal University Al Hassan, Kingdom of Saudi Arabia.

Sayah, Z. et Ould El Hadj, M. D., (2010). Etude comparative des caractéristiques physicochimiques et biochimiques des dattes de la cuvette d'Ouargla. *Annales des Sciences et Technologie*, 2 (1).

Sbiai, A. (2011). *Matériaux composites à matrice époxyde chargée par des fibres de palmier dattier: Effet de l'oxydation au tempo sur les fibres*. Thèse de doctorat en matériaux polymères, Ecole doctorale matériaux, Lyon.

Schomburg, D. and Salzmann, M. (1991). *Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Scriban, R. (1984). *Biotechnologies*, 2^{ème} édition. Paris: Techniques et documentation-Lavoisier.

Siboukeur, O. (1997). *Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes*. Thèse de magistère, INA, El Harrach, Alger.

Siboukeur, O., Ould El Hadj, M. D. et Zargat, F. (2001). *Contribution à l'étude de la production d'acide citrique par Aspergillus niger cultivée sur moût de dattes de la variété Ghars*. *Revue des Energies Renouvelables*, 93-96.

Sidkey, N. M., Abo-Shadi, M. A., Balahmar, R., Sabry, R. and Badrany, G. (2011). Purification and characterization of α -amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F₂Mbb. *International Research Journal of Microbiology*, 2 (3), 96-103. On ligne: <http://www.interestjournals.org/IRJM>

- Sidkey, N. M., Shash, S. M., Ammar, M. S. (1997).** Partial purification and characterization of α -amylase biosynthesized by *A. flavus*, S-7 allowed to grow on hyacinth water homogenate. *Al-Azhar Bull Sci*, 8 (2), 545-561.
- Sindhu, R., Suprabha, G. N. and Shashidhar, S. (2009).** Optimization of process parameters for the production of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 498-500.
- Soccol, C. R., Marin, B. and Raimbault, M. (1994).** Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, (41), 330-336.
- Souza, P. M. et Oliveira, P. et Magalhães, S. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41), 850-861: ISSN 1517-8382
- Takamine, E. J., (1984).** Preparing and making taka-koji. *U. S. Patent*, 525-820.
- Tatsinkou, F. B., Taveai, F., and Ndjouenkeui, R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, 4 (1), 14-18. En ligne: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Tchango Tchango, J. (1996).** *Qualité microbiologique des jus et nectars de fruits exotiques: Croissance et thermorésistance des levures d'altération.* Thèse de Doctorat en Sciences.
- Thierry, N. K. (2015).** *Diversité génétique d'isolats de Cryptococcus et Candida issus des patients VIH positifs à Yaoundé et étude de leur sensibilité aux antifongiques et aux extraits de plantes.* Thèse de Doctorat en Biologie santé et Phytobiochimie, université Montpellier I, France.
- Tonelli, N. et Gallouin F. (2013).** *Des fruits et des graines comestibles du monde* (2^{ème} Ed). Paris: Lavoisier.
- Tortora, J., Funk, B. F. and Case Ch. L. (2003).** *Introduction à la microbiologie.* Canada: Edition ISBN.
- Ulacio, D., Perez, C., and Pineda, Y.J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. *Bioagro. Journal*, 9 (1), 3-11.

Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H. et Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 155 -137, DOI: 0168-1656/02/\$

Van Uden, N. and Fell, J. W. (1968). *Advances in Microbiology of the Sea*, 1^{er} Ed. New York: Academic Press.

Wanderley, K. J., Torres, F. A. and Moraes, L. M. (2004). Characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, 231 (2), 165-9.

West, E. S., Tood, W. R., Mason, H. S. and Van Burggen, J. T. (1967). *Text book of biochemistry*, 4th ed. MacMillan Co, N. Y. Collier MacMillan, Ltd., London.

Wickerham, L. J. (1951). *Taxonomy of yeasts*. United States of America (USA): Department of agriculture, Washington, D.C.

Wickerham, L. J. and Burton, K. A. (1948). Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *Journal of Bacteriology*, (56), 363-371.

Zidani, S. (2009). *Influence des techniques de séchage sur la solubilité des protéines de la levure Saccharomyce scerevisiae produite dans un milieu à base de datte*. Thèse magister en agronomie, université El-hadj Lakhdar, Batna.

Zoubiri, L. (2012). *Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes*. Thèse magister en Biotechnologie alimentaire, universite Mentouri, Constantine.

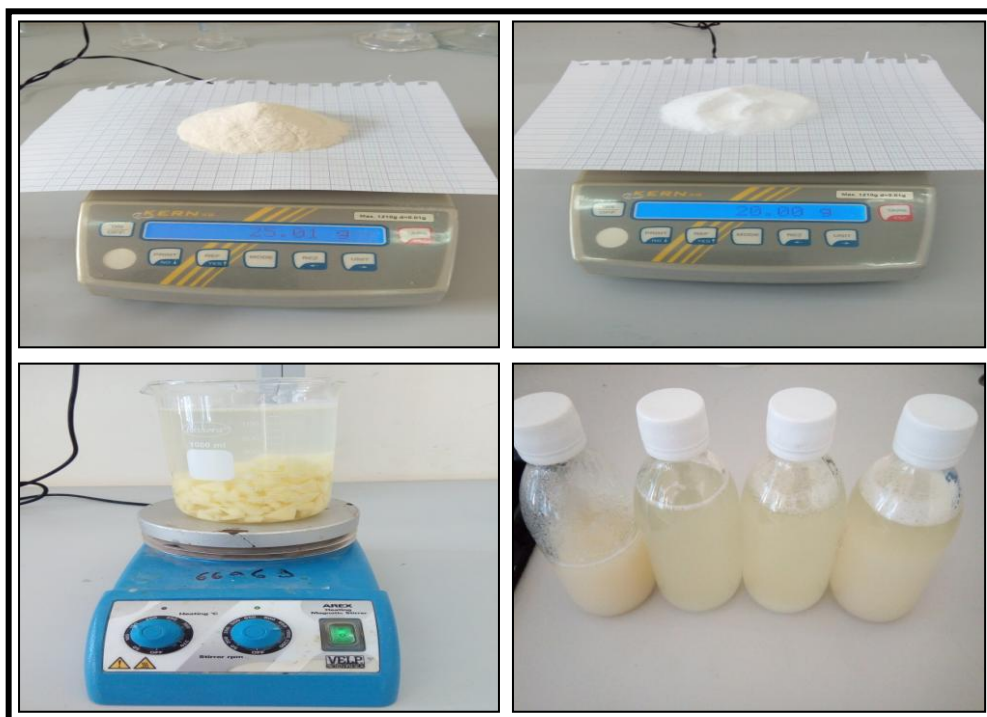
Annexes

Annexe 1: Milieux de culture**1. Potato dextrose agar (PDA) (Guiraud, 1998)****✓ Compositions:**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

✓ Protocole:

- Laver la pomme de terre;
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée;
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min;
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée;
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar;
- Ajouter le glucose;
- Compléter le volume à 1000 ml;
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

**Préparation du milieu PDA.**

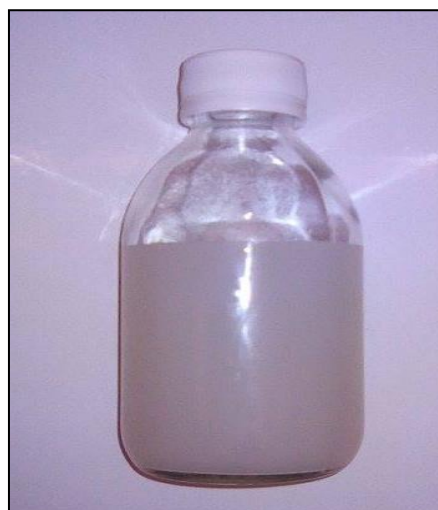
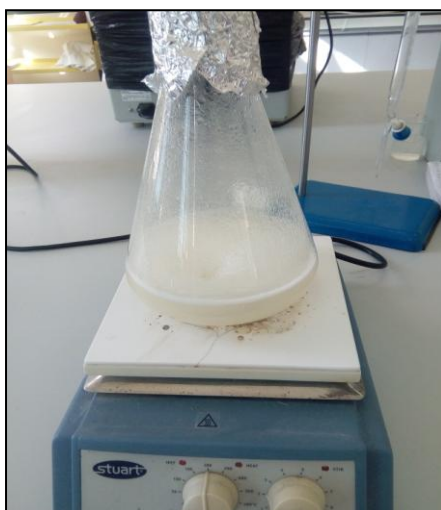
2. Milieux Yeast Carbon Base (YCB)

✓ Compositions:

Glucose	5 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
MgSO ₄	0.125 g
Agar	5 g
Eau distillée	250 ml

✓ Protocole:

- Préparation des ingrédients;
- Ajouter l'agar dans 250 ml d'eau distillée;
- Ajouter le glucose, KH₂PO₄ et MgSO₄;
- Porter à ébullition pendant 30 à 45 min;
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.



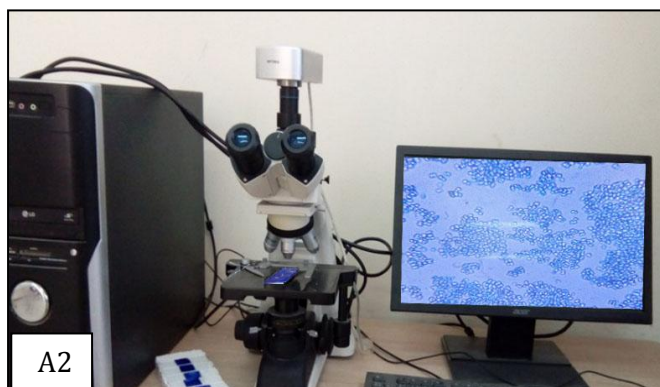
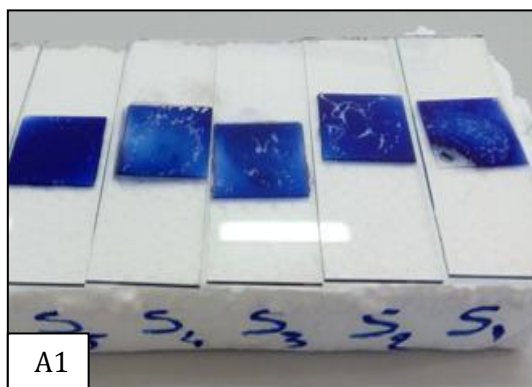
Préparation du milieu YCB.

3. Milieu Eau de levure 0.5 %

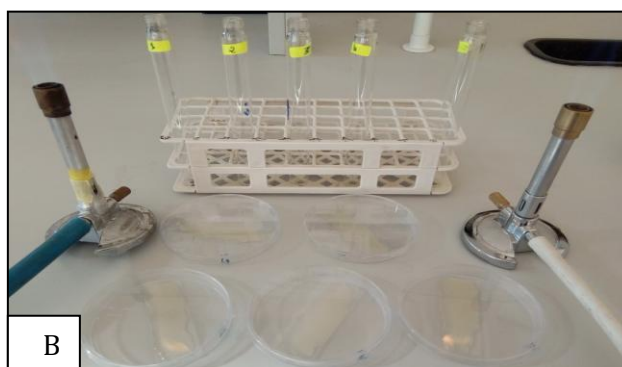
- 5 g Extrait de levure;
- 1000 ml Eau distillé.
- Ajuster le pH à 5.0 et stériliser par autoclavage à 120 °C/ 15 min.

Annexe 2: Identification phénotypique des souches

1. Etude des caractères microscopiques

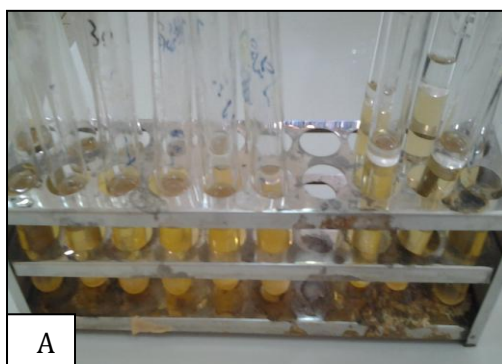


A/ Morphologie cellulaire et mode de multiplication végétative (A1: préparation des échantillons, A2: observation microscopique)



B/ Test de filamentation

2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques



A/ Test de fermentation des sucres sur milieu Eau de levure 0.5 %

B/ Test d'assimilation des composés azotés (nitrate de potassium et sulfate d'ammonium)

Annexe 3: Dosage des sucres totaux (Dubois et *al.*, 1956)

A 1 ml d'extrait enzymatique, on ajoute 10 ml d'eau distillé suivi par l'adition de 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Après l'agitation du tube, laisser refroidir à obscurité pendant 30 min à température ambiante.

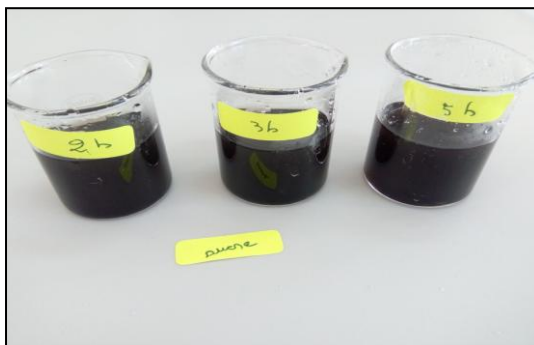
L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 490 nm. Le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml

✓ Réactifs

- Phénol 5 % dans l'eau distillée;
- Acide sulfurique concentré à 95 % de pureté et de densité $d = 1,84$.

✓ Protocole expérimentale

- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 10 ml d'eau distillé suivi par l'adition de 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer 30 min à température ambiante.
- Mesurer la coloration jaune orangé à 490 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établies.

**Dosage des sucres totaux.**

Annexe 4: Dosage des protéines (Bradford, 1976)**✓ Protocole**

Les protéines ont été dosées par la méthode de **Bradford (1976)**, où le bleu de coomassie forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 min, le Sérum Albumine Bovine (SAB) est utilisé comme standard.

✓ Préparation de bleu de coomassie

- 100 mg bleu de coomassie dissous dans 50 ml éthanol à 95 %;
- On ajoute 100 ml d'acide phosphorique à 85 %;
- On complète le volume jusqu'à 1 l par l'eau distillée.

✓ Protocole expérimentale

- 0.1 ml de l'extrait enzymatique;
- On ajoute 5 ml du bleu de coomassie;
- Le mélange est laissé à obscurité pendant 2 à 30 min à la température ambiante;
- L'absorbance est lue à 595 nm.



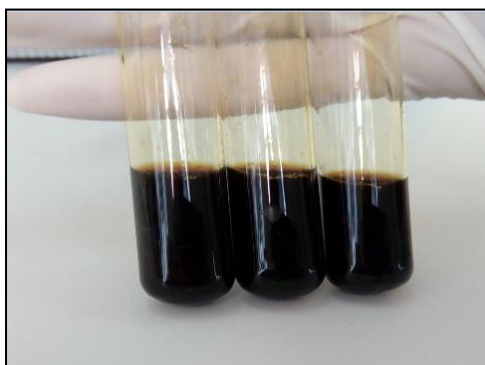
Dosage des protéines.

Annexe 5: Dosage de l'activité α -amylasique (Bernfeld, 1955)**✓ Réactifs pour le dosage de l'amidon**

- Solution d'amidon à 2 g/l;
- Réactif de l'iode: 0.2 g d'I₂ dissous dans 100 ml de KI à 2 % dans 0.1 N HCl;
- 1 M HCl.

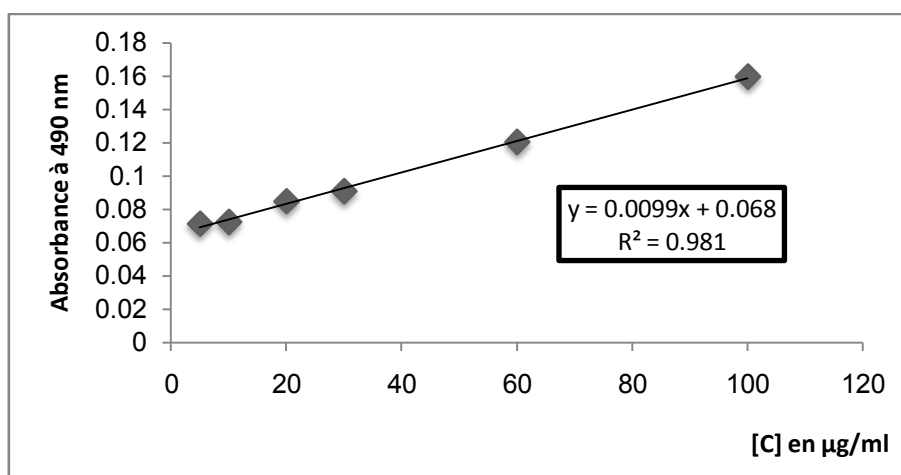
✓ Protocole expérimentale

- 1 ml de l'extrait enzymatique tamponnée à pH= 7 avec du tampon phosphate 0.1 M;
- 1 ml de substrat (solution d'amidon 2g/l);
- Incuber à 50 °C pendant 30 min;
- La réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml HCl suivie de 2,5 ml du réactif de l'iode;
- L'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc (préparé à partir de l'extrait enzymatique dénaturé à 100 °C).

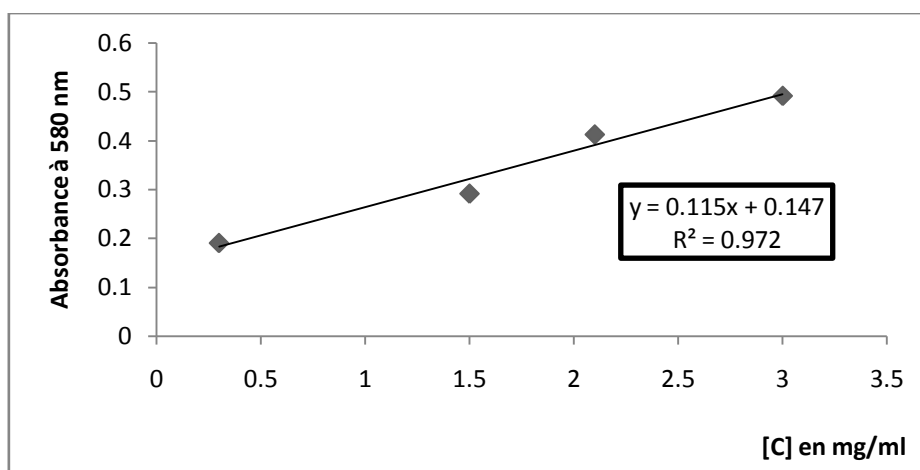


Dosage de l'activité α -amylasique.

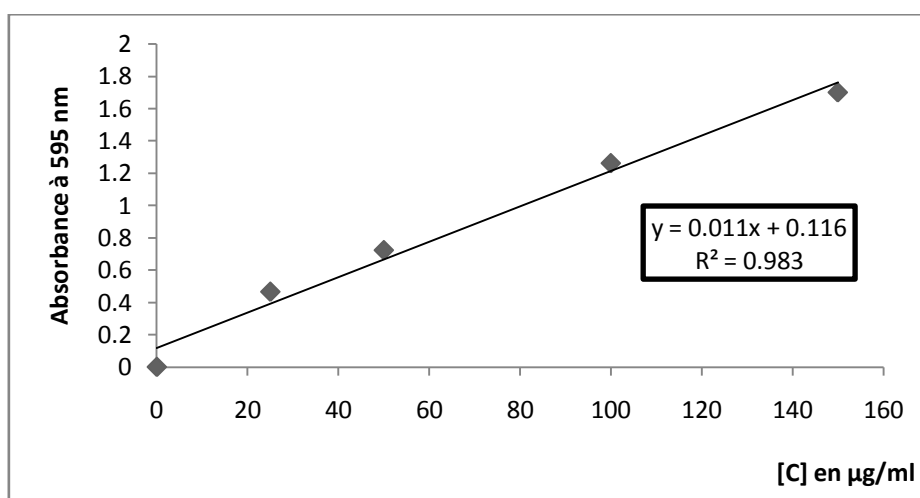
Annexe 6: Courbes d'étalonnages



Courbe d'étalonnage de glucose

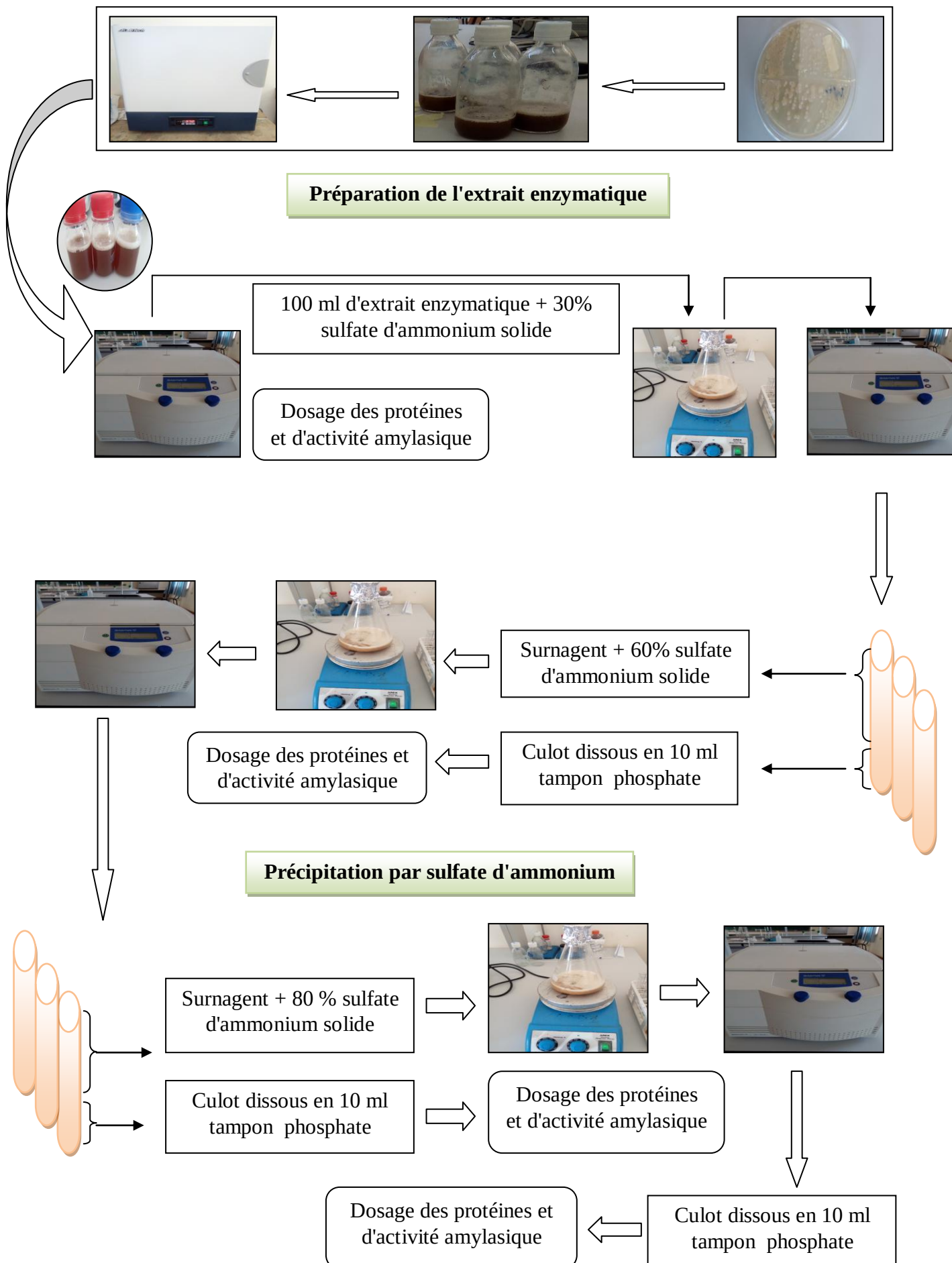


Courbe d'étalonnage d'amidon



Courbe d'étalonnage de protéine (BSA)

Annexe 7: Purification partielle de l' α -amylase



Annexes 8: Attestations de participation au 3^{ème} journée des sciences biologiques

Résumé

Cette étude vise à produire et caractériser une enzyme amylolytique (α -amylase) sécrétée par des levures isolées à partir du sol saharien algérien (Sidi Mastour El-Oued).

Cinq souches levuriennes ont été isolées à partir d'échantillon de sol saharien d'El-Oued. Ces dernières, sont sélectionnées sur un milieu PDA à 4 % d'amidon. Les résultats ont montré que 3 souches seulement ont donné des zones d'hydrolyse. L'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques révèle que ces trois souches appartiennent à l'espèce: *Candida glabrata* (S2), *Rhodotorula mucilaginosa* (S3) et *Candida lusitaniae* (S5).

Par sa richesse en sucre totaux (25.17 %), le sirop de datte est considéré comme milieu favorable à la survie des levures amylolytiques. L'étude cinétique de la production de l' α -amylase est réalisée en batch dans des flacons en verre de 200 ml contenant 50 ml de milieu de base (température de 30 °C et pH 5). Dans ces conditions, on a obtenu une biomasse de 33.75 g/L et une activité amylasique de 2300 μ g/ml/j après 4 jours de fermentation de *C. glabrata*. Par ailleurs, les profils cinétiques de croissance et de production enzymatique ont montré que la synthèse amylasique est de type associée à la croissance de la levure. L'étude comparative des 3 isolats pour la production des α -amylases a sélectionné *C. glabrata*, pour leur activité amylolytique élevée par rapport aux autres.

La purification partielle de l' α -amylase de *C. glabrata* par le sulfate d'ammonium (60 %), a donné une activité spécifique d'enzyme de 78.88 U/mg avec une degré de purification de 2.73 fois. L' α -amylase partiellement purifié, a un pH optimum de 6 et une température optimale de 55 °C. L'étude cinétique de l' α -amylase de *C. glabrata* partiellement purifiée a donné une $V_{\max}$ de (1016.26 μ g/ml) et un K_m de (0,27 mg/ml).

Mots clés: α -amylase, *Candida glabrata*, Levure, Purification, Sirop de datte.

Abstract

This study aims to produce and characterize an amylolytic enzyme (α -amylase) secreted by yeasts isolated from algerian saharan soil (Sidi Mastour El-Oued).

Five yeast strains were isolated from a sample of El-Oued saharan soil. The latter are selected on a 4 % of starch PDA medium. The results showed that only 3 strains gave zones of hydrolysis. The study of the morphological, physiological and biochemical characteristics reveals that these three strains belong to the species: *Candida glabrata* for S2, *Rhodotorula mucilaginosa* for S3 and *Candida lusitaniae* for S5.

By its richness in total sugar (25.17%), date syrup is considered as a medium favorable to the survival of amylolytic yeasts. The kinetic study of the production of α -amylase is carried out in batch in 200 ml vials containing 50 ml of base medium (temperature is 30 °C and pH 5). Under these conditions, a biomass of 33.75 g/L and an amylase activity of 2300 μ g/ml/day were obtained after 4 days of fermentation of *C. glabrata*. Moreover, the kinetic profiles of growth and of enzymatic production have shown that the amylase synthesis is of a type associated with the growth of the yeast. The comparative study of the 3 isolates for the production of α -amylases selected *C. glabrata* for their high amylolytic activity compared to the others.

Partial purification of *C. glabrata* α -amylase by ammonium sulfate (60%) gave an enzyme specific activity of 78.88 U / mg with a purification degree of 2.73 folds. The partially purified α -amylase has an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 55 °C. The kinetic study of partially purified *C. glabrata* α -amylase gave a $V_{\max}$ value (1016.26 μ g/ml) and a K_m value (0.27 mg/ml).

Key words: α -amylase, *Candida glabrata*, Date syrup, Purification, Yeast.

